

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
NEUROLOGIE  
(PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN)  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG ADULTER NEURALER  
STAMMZELLEN: DER EINFLUSS INHÄRENTER, ARTIFIZIELLER UND  
PHYSIOLOGISCHER FAKTOREN

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des

Doktorgrades der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Thorsten Michael Schiller**

2010





AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
NEUROLOGIE  
(PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN)  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG ADULTER NEURALER  
STAMMZELLEN: DER EINFLUSS INHÄRENTER, ARTIFIZIELLER UND  
PHYSIOLOGISCHER FAKTOREN

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des

Doktorgrades der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Thorsten Michael Schiller**

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ludwig Aigner

2. Berichterstatter: PD Dr. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 2010

Meinen Eltern

	<b>Seite</b>
<b><u>A) ALLGEMEINER TEIL</u></b>	
<b>I. Einführung</b>	
<i>Cajal irrt – die Entdeckung der Neurogenese</i>	10
<b>II. Die Neurogenese im adulten ZNS</b>	
<i>Neurogenese findet in bestimmten Regionen des Gehirns statt.</i>	11
<i>Neurogenese beruht auf Stammzellen.</i>	12
<i>Neurogenese ist modifizierbar.</i>	15
<b>III. TGF <math>\beta_1</math> – ein Schlüssel in der Neurogenese?</b>	
<i>TGF-<math>\beta</math> und seine Signaltransduktion</i>	16
<i>Funktion von TGF-<math>\beta_1</math> im adulten ZNS</i>	17
<i>TGF-<math>\beta_1</math> als Überlebens- und neurotropher Faktor</i>	19
<i>TGF-<math>\beta_1</math> wirkt zytostatisch und inhibiert Neurogenese</i>	19
<b>IV. Die Beeinflussung der Neurogenese – was bringt's?</b>	
<i>Bekannte Methoden</i>	20
<i>Neurogenese stellt eine Therapieoption für neuropathogene Zustände dar.</i>	21
<b><u>B) MATERIAL UND METHODEN</u></b>	
<b>I. Gewinnung adulter neuraler Stammzellen</b>	24
<b>II. Zellkultur</b>	25
<b>III. Differenzierung der Zellen</b>	25
<b>IV. Immunfluoreszenz</b>	26
<b>V. DNA-Färbung und FACS-Analyse</b>	28
<b>VI. Auswertung der Daten</b>	29
<b><u>C) ERGEBNISSE</u></b>	
<b>I. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit vom artifiziellen externen Einfluss</b>	
<b>I.1. Expression von Nestin</b>	
<i>I.1.1. Subventrikulärzone</i>	30
<i>I.1.2. Rückenmark</i>	31
<i>I.1.3. Hippocampus</i>	31
<b>I.2 Expression von KI-67</b>	
<i>I.2.1. Subventrikulärzone</i>	34
<i>I.2.2. Rückenmark</i>	34
<i>I.2.3. Hippocampus</i>	35

<b>I.3 Expression von <math>\beta</math>3-Tubulin</b>	
<i>I.3.1. Subventrikulärzone</i>	37
<i>I.3.2. Rückenmark</i>	37
<i>I.3.3. Hippocampus</i>	38
<b>I.4 Expression von GFAP</b>	
<i>I.4.1. Subventrikulärzone</i>	40
<i>I.4.2. Rückenmark</i>	40
<i>I.4.3. Hippocampus</i>	41
<b>II. Die neurogene Region als Faktor der Neurogenese</b>	
<b>II.1. Proliferation</b>	43
<b>II.2. Expression von Nestin</b>	44
<b>II.3. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit von der neurogenen Region als inhärentem Faktor</b>	
<i>II.3.1. Expression von Nestin</i>	
<b>II.3.1.1. Unbehandelte Zellen</b>	45
<b>II.3.1.2. Behandlung mit 1% FCS</b>	46
<b>II.3.1.3. Behandlung mit 5% FCS</b>	46
<b>II.3.1.4. Behandlung mit CFK</b>	46
<i>II.3.2. Expression von KI-67</i>	
<b>II.3.2.1. Unbehandelte Zellen</b>	47
<b>II.3.2.2. Behandlung mit 1% FCS</b>	47
<b>II.3.2.3. Behandlung mit 5% FCS</b>	48
<b>II.3.2.4. Behandlung mit CFK</b>	48
<i>II.3.3. Expression von <math>\beta</math>3-Tubulin</i>	
<b>II.3.3.1. Unbehandelte Zellen</b>	49
<b>II.3.3.2. Behandlung mit 1% FCS</b>	49
<b>II.3.3.3. Behandlung mit 5% FCS</b>	50
<b>II.3.3.4. Behandlung mit CFK</b>	50
<i>II.3.4. Expression Von GFAP</i>	
<b>II.3.4.1. Unbehandelte Zellen</b>	51
<b>II.3.4.2. Behandlung mit 1% FCS</b>	52
<b>II.3.4.3. Behandlung mit 5% FCS</b>	52
<b>II.3.4.4. Behandlung mit CFK</b>	52

### **III. Änderung der Morphologie**

#### **III.1. Morphologie in Abhängigkeit von der Herkunft der Stammzellen**

<i>III.1.1. Zellen aus der Subventrikulärzone</i>	54
<i>III.1.2. Zellen aus dem Rückenmark</i>	54
<i>III.1.3. Zellen aus dem Hippocampus</i>	55

#### **III.2. Änderung der Morphologie in Abhängigkeit vom externen Einfluss**

<i>III.2.1. 5% FCS</i>	55
<i>III.2.2. CFK</i>	56

### **IV. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit von TGF $\beta$ als physiologischem Faktor**

#### **IV.1. Expression von Nestin**

<i>IV.1.1. Proliferationsmedium</i>	58
<i>IV.1.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	58

#### **IV.2. Expression von $\beta$ 3-Tubulin**

<i>IV.2.1. Proliferationsmedium</i>	59
<i>IV.2.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	59

#### **IV.3. Expression von GFAP**

<i>IV.3.1. Proliferationsmedium</i>	59
<i>IV.3.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	59

#### **IV.4. Expression von NG2**

<i>IV.4.1. Proliferationsmedium</i>	60
<i>IV.4.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	60

#### **IV.5. Expression von GalC**

<i>IV.5.1. Proliferationsmedium</i>	60
<i>IV.5.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	60

#### **IV.6. Expression von TGF-Rezeptor II**

<i>IV.6.1. Proliferationsmedium</i>	61
<i>IV.6.2. Behandlung mit 5% FCS</i>	61

**D) DISKUSSION DER ERGEBNISSE**

<b>I. Findet Neurogenese im Rückenmark statt?</b>	<b>63</b>
<b>II. Besteht ein Unterschied zwischen Vorläuferzellen aus den verschiedenen neurogenen Zonen und den verschiedenen Differenzierungsansätzen?</b>	
<b>II.1. Proliferationsmedium</b>	<b>64</b>
<b>II.2. Behandelte Zellen</b>	<b>65</b>
<b>II.3. FCS: Die Konzentration macht den Unterschied</b>	<b>67</b>
<b>III. Wie verändert TGF- <math>\beta_1</math> die Eigenschaften der neuralen Vorläuferzellen?</b>	
<b>III.1. TGF- <math>\beta_1</math> moduliert die Zellproliferation</b>	<b>68</b>
<b>III.2. Die zwei Seiten des TGF-<math>\beta_1</math></b>	<b>69</b>
<b><u>E) ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>71</b>
<b><u>F) LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>73</b>

**A) Allgemeiner Teil****I. Einführung***Cajal irrt – die Entdeckung der Neurogenese*

Einer der meistzitierten Autoren in den Neurowissenschaften ist zu dieser Ehre wegen eines Irrtums gekommen: Santiago Ramon y Cajal (Abb. 1), Neuroanatom und Nobelpreisträger, stellte 1913 die Hypothese auf, dass im erwachsenen ZNS keinerlei Regeneration, weder axonales Wachstum, noch Zellersatz durch Proliferation, möglich sei (Cajal, 1928).

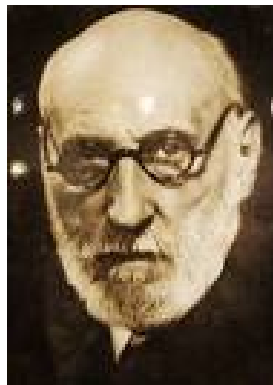


Abb.1: Dr. Santiago Ramón y Cajal

Da dies auch mit den Beobachtungen übereinstimmte, dass bei Krankheiten und Zustände die mit dem Verlust von Neuronen im ZNS einhergehen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder traumatische Schädigung, keine Heilung möglich ist, bzw. diese progressiv verlaufen, blieb Cajals Aussage quasi als Dogma über Jahrzehnte unangetastet.

So dauerte es bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts, als erstmals Forschungsergebnisse darauf hindeuteten, dass Neubildung von Nervenzellen im erwachsenen ZNS eben doch stattfinden kann. Altman und Das gelang es 1965, durch  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung, neu entstandene Zellen im ZNS von erwachsenen Ratten nachzuweisen (Altman and Das, 1965). Jedoch blieb die Art und Anzahl dieser Zellen weiterhin unbekannt. Noch einmal ca. 20 Jahre



mussten vergehen, bis durch weitere richtungsweisende Forschungsarbeiten Licht in dieses Dunkel gebracht werden konnte.

## II. Die Neurogenese im adulten ZNS

*Neurogenese findet in bestimmten Regionen des Gehirns statt.*

Bei der Erforschung der Neurogenese rückten vor allem zwei Regionen des Gehirns in den Mittelpunkt des Interesses: Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass in erwachsenen Tieren Vorläuferzellen aus der Subventrikulärzone der Seitenventrikel über den rostra-migratorischen Pfad in den Bulbus olfactorius wandern, um dort zu Neuronen auszdifferenzieren (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Alvarez-Buylla and Lois, 1995; Goldman, 1995). Zum anderen konnten auch im Gyrus dentatus Neurogenese nachgewiesen werden (Altman and Das, 1965; Kuhn et al., 1996; Palmer et al., 1997). Ebenso konnte durch Transplantationsexperimente gezeigt werden, dass die Vorläuferzellen aus den einzelnen Regionen in ihrer Differenzierung nicht auf regionale Zelltypen beschränkt sind. Suhonen et al. transplantierten Vorläuferzellen aus dem Hippocampus in den rostra-migratorischen Pfad, welche dann in den bulbus olfactorius wanderten und dort zu Bulbusneuronen differenzierten (Suhonen et al., 1996). Zusammenfassend kann man also sagen, dass Neurogenese in folgenden Regionen des adulten ZNS zu finden ist: In der lateralen Wand der Seitenventrikel, im Hippocampus und im rostra-migratorischen Pfad (Crews FT et al., 2003) (Abb. 2.).

Neben diesen neurogenen Zonen wurden Vorläuferzellen auch noch in weiteren Gebieten des adulten ZNS beschrieben, so im Rückenmark (Horner et al., 2000) oder in der Retina (Engelhardt et al., 2004). Es stellt sich natürlich nun die Frage nach der Identität dieser Vorläuferzellen.

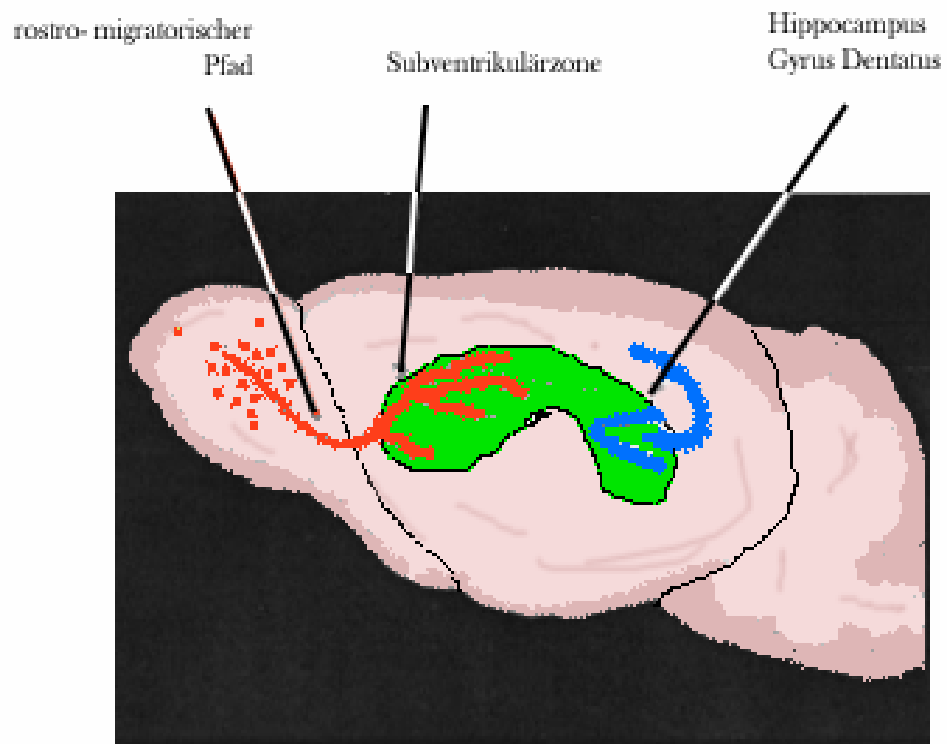


Abb 2.: Regionen, in denen Neurogenese stattfindet (nach Crews et. al 2003)

### *Neurogenese beruht auf Stammzellen.*

Die Zellen des Zentralnervensystems entstehen während der Embryonalentwicklung aus Stammzellen, die das Neuralrohr in Form eines Ventrikelepithels auskleiden. Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen als auch zur unbegrenzten Zellerneuerung durch Zellteilung besitzen. Weiter unterteilen lassen sich Stammzellen nach ihrem ontogenetischen Entwicklungsgrad, embryonal bis adult, nach ihrer Potenz, totipotent bis multipotent, sowie nach ihrer Organspezifität. Totipotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in alle Zelltypen eines Organismus zu entwickeln, pluripotente oder multipotente Stammzellen können sich zwar noch in viele, aber nicht mehr alle Zelltypen differenzieren. Als pluripotent sollte dabei eine Stammzelle angesprochen werden, die fähig ist, Zellen verschiedener Keimblätter zu bilden. Multipotente Zellen hingegen sind in ihrer Entwicklung auf einzelne Zelllinien, wie z.B.

hämatopoetische, neurale oder muskuläre, festgelegt (Baizabal, 2003). Embryonale Stammzellen sind diejenigen Zelle, die als innere Zellmasse dem Blastulastadium entnommen. Sie stellen pluripotente Zellen dar. Später in der Embryonalentwicklung bilden sich multipotente Stammzellen aus, die bereits in ihrem Differenzierungspotential auf Zellen des Nervensystems festgelegt sind. Diese Zellen persistieren auch im adulten ZNS, wo sie zeitlebens die Fähigkeit besitzen, sich zu erneuern und in verschiedene Zelltypen auszdifferenzieren. Als neurale Stammzellen werden spezialisierte Astrozyten angesehen (Doetsch et al., 1999), welche als B-Zellen bezeichnet werden und in den neurogenen Zonen des Gehirns in bestimmter Anordnung das Substrat für die Neurogenese darstellen (Seri et al., 2004). Diese oben angesprochene Anordnung wird als Stammzellnische bezeichnet und besteht aus speziellen Zellen sowie extrazellulärer Matrix.

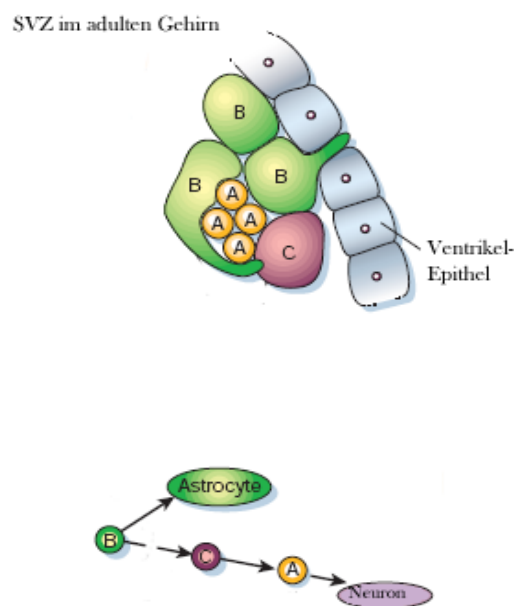


Abb.3: Die Stammzellnische in der SVZ: A=TypA Neuroblast, B=TypB Stammzelle/Astrozyt, C=TypC, Vorläuferzelle und Schema der Differenzierung (modifiziert aus (Temple, 2001))

Neurale Stammzellen differenzieren in reife Neurone bzw. Glia über verschiedene Stadien, von denen jede eine spezifische Antigenkombination aufweist (Palmer et al., 1997) (vgl. Abb.4).

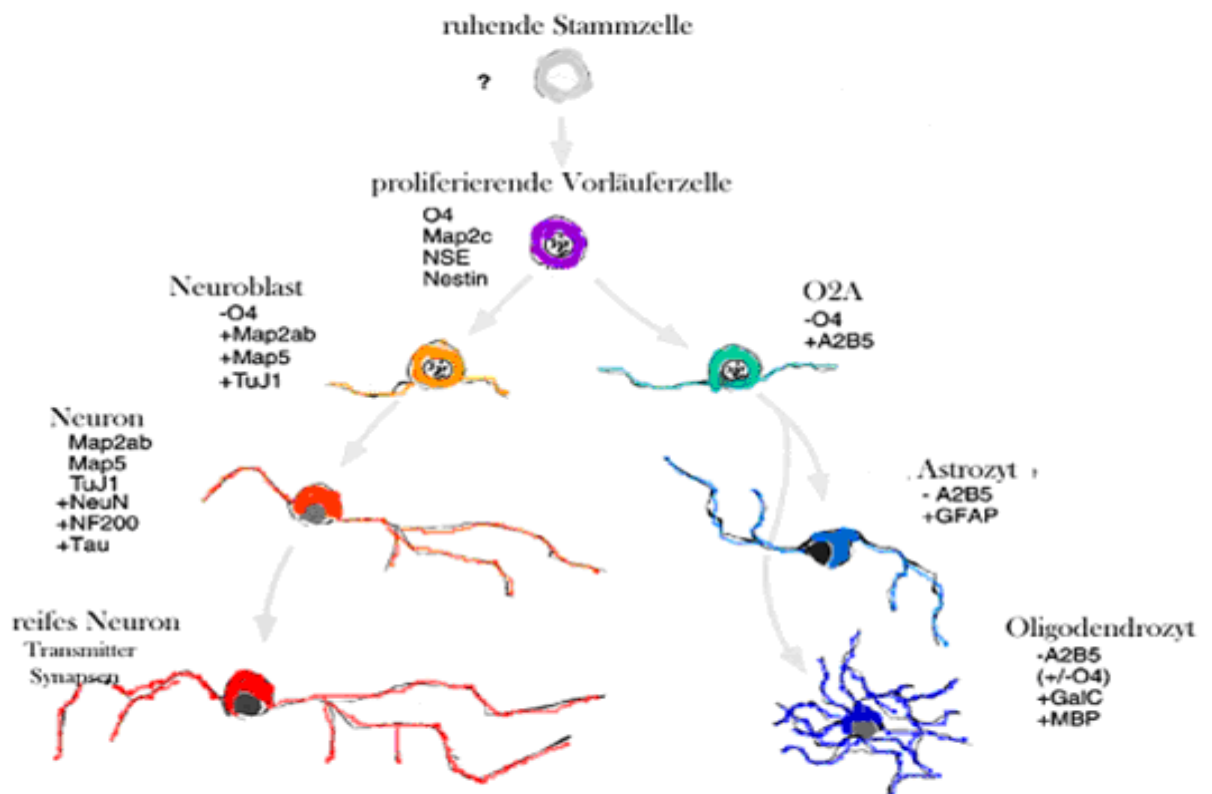


Abb. 4: Stadien der Differenzierung einer ruhenden Stammzelle in reife Neurone bzw. Glia im adulten ZNS und typische Antigene der jeweiligen Stadien (Palmer et al., 1997)

Ein für proliferierende Vorläuferzellen charakteristisches Antigen ist Nestin, ein 1990 erstmals von Lendahl et al. beschriebenes Intermediärfilament (Lendahl et al., 1990). Ein weiteres Antigen, welches die Proliferation der Vorläuferzellen anzeigt, ist Ki-67. Es wird während der G<sub>1</sub>-, der S-, der G<sub>2</sub>- und der M-Phase im Zellkern exprimiert, nicht jedoch in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Gatter KC, 1986; Turbitt ML, 1986). Eine weitere Klasse von Antigenen, die in der Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen auftreten, sind die MAPs. MAP

steht für microtubule-associated protein. MAP2a+b gehört zu den spät auftretenden MAPs und tritt auf, wenn die Vorläuferzelle bereits in Richtung Neuron festgelegt ist (Tanaka et al., 1992). Ebenfalls eine neuronale Differenzierung zeigt  $\beta_3$ -Tubulin an (Laferriere and Brown, 1996). Tubulin ist der Hauptbestandteil von Mikrotubuli, welche eine Schlüsselrolle bei Mitose, intrazellulärem Transport und im Zytoskelett spielen. Es gibt fünf Unterformen der beta-Tubuline, von denen beta3 Tubulin spezifisch für Neurone ist.

### *Neurogenese ist modifizierbar.*

Das Ausmaß der Neurogenese und damit der Regenerationsfähigkeit des ZNS hängt von verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Faktoren ab. So hat sich zum Beispiel gezeigt, dass akute Ischämien, wie sie beim Schlaganfall auftreten, eine Erhöhung der Neurogenese bedingen, welche allerdings nur vorübergehend auftritt (Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002; Parent Jack M. et al., 2002). Auch eine reizreiche Umgebung regt die Neurogenese an (Altman and Das, 1964; Kempermann et al., 1998). Andererseits vermindert sich die Neurogenese bei chronisch degenerativen Prozessen, wie Morbus Alzheimer und bei entzündlichen Veränderungen (Feng et al., 2001; Haughey et al., 2002; Monje et al., 2002; Winner et al., 2004). Bei der Erforschung dieser verringerten Neurogenese lenkten die Ergebnisse die Aufmerksamkeit vor allem auf Entzündungsprozesse, welche durch Interleukin IL 6 moduliert sind (Monje et al., 2003). Doch auch Transforming Growth Factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) scheint einen Einfluss auf das Ausmaß der Neurogenese zu haben. So zeigt sich die Expression von TGF- $\beta_1$  mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (van der Wal et al., 1993; Mogi et al., 1995; Vawter et al., 1996; Houi et al., 2002; Ilzecka et al., 2002). Zudem beeinflusst TGF- $\beta_1$  die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen (Border and Noble, 1994; Chen et al., 2001; Dennler et al., 2002). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden,

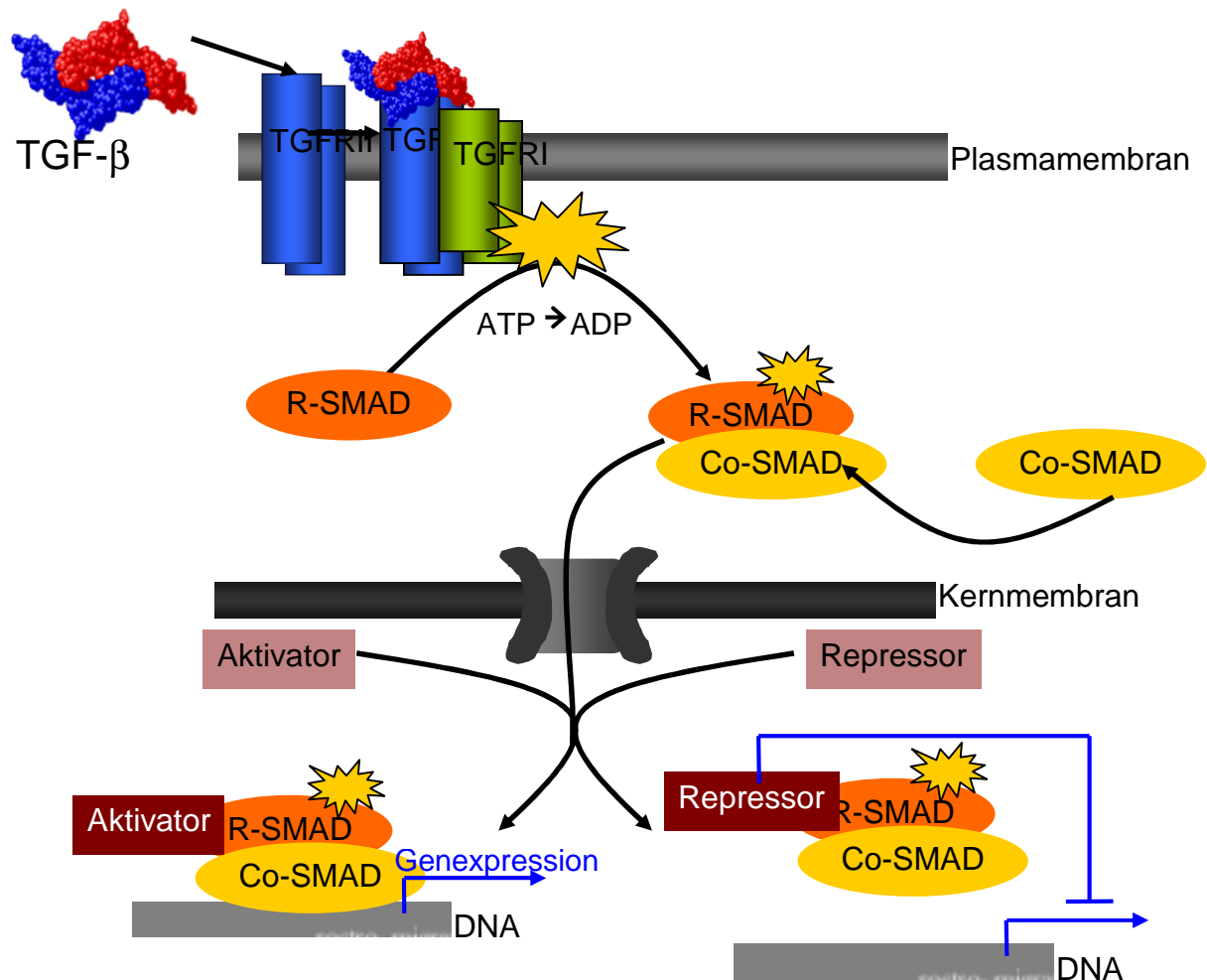
dass TGF- $\beta_1$  die Proliferationsrate neuraler Stammzellen vermindert (Wachs et al., 2006).

### III. TGF $\beta_1$ – ein Schlüssel in der Neurogenese?

#### *TGF- $\beta$ und seine Signaltransduktion*

Zur TGF  $\beta_1$ -Superfamilie gehören mehr als 100 verschiedene Proteine, u.a. auch Aktivine, Inhibine, Bone Morphogenic Proteine (BMPs) und verschiedene Faktoren für Wachstum und Differenzierung (growth / differentiation factors, GDF's). Die Gruppe der TGF- $\beta$ s umfasst bei Säugetieren drei verschiedene Isoformen, TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  und TGF- $\beta_3$  (Massague, 1987; Bottner et al., 2000). Die Zelle sezerniert alle TGF- $\beta$ s als inaktive Vorläuferproteine. Diese müssen aktiviert werden, bevor sie an die Zielstruktur auf der Zelloberfläche binden können. Die biologisch aktive Form des TGF- $\beta_1$  ist ein Homodimer, welches aus zwei jeweils 12,5 kD großen Peptiden besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Bottner et al., 2000; Dennler et al., 2002).

Alle drei TGF- $\beta$ s kontaktieren dasselbe Serin-Threonin-Kinase-Rezeptorsystem, welches aus den Rezeptortypen I und II besteht. Derzeit kennt man sieben verschiedene Isoformen des Rezeptortyps I und fünf des Typs II (Bierie B, 2006). Offensichtlich ist die Zelltyp-spezifische Verteilung dieser Isoformen zusammen mit zusätzlichen modulierenden Faktoren für die unterschiedlichen zellulären Effekte der TGF- $\beta$ s verantwortlich (Shi Y, 2003). TGF-Rezeptor II stellt den TGF-bindenden Anteil des Rezeptors dar. TGF-Rezeptor I kann nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierung mit einer Reihe von spezifischen zytoplasmatischen Proteinen interagieren. Als wichtigste Gruppe ist hier die Familie der Smad-Proteine zu nennen, welche nach Aktivierung in den Nukleus der Zelle transduziert werden und dort die Genexpression beeinflussen (Abb. 5)

Abb. 5: Signalkaskade von TGF- $\beta_1$ , aus (Aigner L, 2007)

### *TGF- $\beta$ im ZNS*

Die oben genannten Rezeptoren finden sowohl im embryonalen wie auch im adulten ZNS weite Verbreitung (Böttner M, 1996; Vivien D, 1998; Böttner et al., 2000). Die mRNA des TGFR II konnte u.a. im zerebralen Kortex, Mittelhirn, Kleinhirn und Hirnstamm in einer Vielzahl von Zellen (Neuronen, Astroglia, Mikroglia, Endothelzellen und anderen nicht-neuronalen Zellen wie jenen des chorioidalen Plexus) nachgewiesen werden (Morita et al., 1996; Ata et al., 1999; De Groot et al., 1999; Sousa Vde O, 2006). Radiale Gliazellen exprimieren ebenfalls TGFR I und TGFR II (Galter D, 1999; Miller, 2003; MW., 2003). Da diese in letzter Zeit als Stamm- bzw. Vorläuferzellen für neurale Zellen in der Gehirnentwicklung identifiziert worden waren (Malatesta

et al., 2003), liegt der Schluss nahe, dass TGF- $\beta$  eine Rolle in der Neurogenese spielt.

### *Funktion von TGF- $\beta_1$ im adulten ZNS*

Im adulten ZNS spielt TGF- $\beta_1$  vor allem eine Rolle bei Läsionen und degenerativen Erkrankungen (vgl. Tabelle 1)

Immunmodulation	
Fördert Wundheilung und Immunsuppression	(Suzumura et al., 1993; Pratt and McPherson, 1997; Boche et al., 2006)
Migration	
Fördert Migration von Astrozyten und beeinflusst deren Genexpression	(Labourdette et al., 1990; Toru-Delbauffe et al., 1990; Baghdassarian et al., 1993; Laping et al., 1994; Gagelin et al., 1995; Siegenthaler and Miller, 2004; Gomes et al., 2005)
Extrazelluläre Matrix	
Produktion extrazellulärer Matrix	(Plow et al., 1995; Wyss-Coray et al., 1995; Buisson et al., 1998; Docagne et al., 1999; Docagne et al., 2002; Brionne et al., 2003)
Neuroprotektion	
Fördert das Überleben von Neuronen	(Flanders et al., 1998; Krieglstein et al., 1998; Krieglstein et al., 1998; Krieglstein et al., 1998; Brionne et al., 2003; Roussa et al., 2004)
Zellproliferation	
Inhibiert gliale und mikrogliale Zellteilung	(Johns et al., 1992; Lindholm et al., 1992; Morganti-Kossmann et al., 1992; Baghdassarian et al., 1993; Hunter et al., 1993; McKinnon et al., 1993; Suzumura et al., 1993; Vergeli et al., 1995; Rich et al., 1999)
Inhibiert Neuroblastenproliferation	(Constam et al., 1994; Miller and Luo, 2002; Close et al., 2005)
Inhibiert Proliferation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen und Neurogenese	(Buckwalter et al., 2006; Wachs et al., 2006)

Tabelle 1: Funktionen von TGF- $\beta_1$  im adulten ZNS (aus (Aigner L, 2007))



Jede Schädigung des ZNS gibt einen Entzündungsreiz und geht mit Aktivierung der Mikroglia einher. Konkrete Stimuli der Entzündung sind dabei Signalmoleküle, die von gestressten / sterbenden Neuronen ausgesendet werden, eine übermäßige Anhäufung von Protein-Aggregaten oder aber die fehlerhafte Regulation der Immunantwort (Wyss-Coray and Mucke, 2002). Mikrogliale Zellen sezernieren nach ihrer Aktivierung verschiedene Signalgebende Zytokine, die schwere Entzündungsreaktionen dämpfen und neuroprotektiv wirken. Zu diesen Zytokinen zählt auch TGF- $\beta_1$ . In der Folge kann dieses Molekül die Aktivierung sowie die Proliferation der Mikroglia unterdrücken (Suzumura et al., 1993). Es scheint demnach die Entzündungsantwort nach einem entsprechenden Schaden am ZNS regulieren und begrenzen zu können (Boche et al., 2006).

#### *TGF- $\beta_1$ als Überlebens- und neurotropher Faktor*

Bekannt ist, dass TGF- $\beta_1$  eine Rolle für das Überleben von Neuronen spielt und neuroprotektive Wirkung auf eine Vielzahl peripherer und zentraler Neurone entfaltet (Krieglstein et al., 1998; Krieglstein et al., 1998; Krieglstein et al., 1998; Roussa et al., 2004). Der Verlust von TGF- $\beta_1$  in TGF- $\beta_1$  deletierten Mäusen wirkt sich negativ auf die neuronale Überlebensrate aus, wie anhand des Gewebes der Tiere und an Zellkulturen gezeigt werden konnte (Brionne et al., 2003). Die Gehirne dieser Tiere zeichnen sich aus durch vermehrt apoptotische Neurone, eine reduzierte Expression von Laminin und eine weit verbreitete Mikrogliose (Brionne et al., 2003).

#### *TGF- $\beta_1$ wirkt zytostatisch und inhibiert Neurogenese*

TGF- $\beta_1$  besitzt – wohl abhängig vom zellulären Umfeld – unter anderem stark antiproliferative Eigenschaften. Der erste Zelltyp, für den proliferationshemmende Effekte durch TGF- $\beta_1$  beschrieben wurden, waren in vitro kultivierte Astrozyten (Johns et al., 1992; Lindholm et al., 1992; Morganti-

Kossmann et al., 1992; Baghdassarian et al., 1993; Rich et al., 1999). Der Faktor konnte dabei die Zellteilungsrate entweder unmittelbar beeinflussen, oder aber er trat als Antagonist auf zu anderen Wachstumsfaktoren wie FGF, EGF, PDGF, IL $\alpha$  und Interleukin 2 (Hunter et al., 1993; Vergeli et al., 1995). TGF- $\beta_1$  scheint nicht nur die Proliferation der Astrozyten zu hemmen, sondern gleichzeitig deren Differenzierung zu fördern (de Sampaio e Spohr et al., 2002; Sousa Vde et al., 2004). Daneben bremst TGF- $\beta_1$  auch die Proliferation mikroglialer und oligodendroglialer Zellen (McKinnon et al., 1993; Suzumura et al., 1993). Allerdings beschränkt sich die anti-proliferative Wirkung von TGF- $\beta_1$  nicht auf Astrozyten und Mikroglia, sondern sie ist auch für fötale kortikale, postnatale cerebelläre und retinale Neuroblasten und Vorläuferzellen gezeigt (Constam et al., 1994; Miller and Luo, 2002; Close et al., 2005). In dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern sich diese bekannte Neurogenese-inhibierende Eigenschaft auf die Identität der Stamm- bzw. Vorläuferzellen auswirkt, sprich ob diese nach Behandlung mit TGF- $\beta_1$  noch in der Lage sind, in alle drei Zelllinien des ZNS – Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten – auszudifferenzieren.

#### **IV. Die Beeinflussung der Neurogenese – was bringt's?**

##### *Bekannte Methoden*

Der Gedanke, Neurogenese in vitro und in vivo artifiziell zu beeinflussen, liegt natürlich nahe. Hauptsächlich verwendete Maßnahmen zur Differenzierung von Stammzellen sind der Entzug von Wachstumsfaktoren (Oishi et al., 2004), Behandlung mit fötalem Kälberserum in verschiedenen Konzentrationen (Ciccolini and Svendsen, 1998; Gritti et al., 2002; Oishi et al., 2004) und Steigerung des intrazellulären cyclischen Adenosin Mono Phosphats (cAMP) durch Verwendung von di butyryl- cAMP (db-cAMP) (Kim et al., 2002) oder Forskolin (Hansen TO, 2003; Stachowiak et al., 2003), einem Induktor der Adenylatcyclase. Weitere Differenzierungsansätze beruhen auf Antioxidantien,

wie all-trans-Retinolsäure (Takahashi et al., 1998),  $\beta$ -Mercaptoethanol (Hung SC et al., 2002) oder N-Acetylcystein.(Ni L, 2001)

Welchen Einfluss unveränderbare, also inhärente Faktoren, wie die neurogene Region, auf das Differenzierungsverhalten und die Proliferationsfähigkeit der Vorläuferzellen hat, wurde bislang kaum erforscht.

*Neurogenese stellt eine Therapieoption für neuropathogene Zustände dar.*

Gerade die Möglichkeit, Neurogenese zu modulieren, zusammen mit der Eigenschaft der neuralen Vorläuferzellen, sowohl zu Neuronen, wie auch zu Astrozyten und zu Oligodendrozyten zu differenzieren (Gage, 2000), zusammen mit der Möglichkeit, sie über viele Passagen ohne Verlust ihrer Multipotenz in Kultur zu halten (Wachs et al., 2003), lassen neurale Vorläuferzellen als vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung degenerativer oder traumatischer zentralnervöser Erkrankungen erscheinen (Fisher, 1997; Svendsen et al., 1997; Ostenfeld T, 2003; Picard-Riera et al., 2004), zumal Neurogenese auch beim Menschen nachgewiesen werden konnte (Berry, 1986; Arsenijevic et al., 2001). Denn leider bleibt die Tatsache, dass das adulte ZNS bei traumatischer Schädigung oder pathologischen Zuständen zur suffizienten spontanen Regeneration nicht fähig ist, ja bestehen, ungeachtet dessen, dass Zellersatz durch Stammzellen möglich wäre. Wie also könnte dieses Potential genutzt werden? Hierzu werden zwei Strategien diskutiert: Zum einen die Stimulation der endogenen Neurogenese (Picard-Riera et al., 2004), zum anderen die Züchtung und Transplantation körpereigener neuraler Stammzellen (Fisher and Gage, 1993)(Abb. 6.)

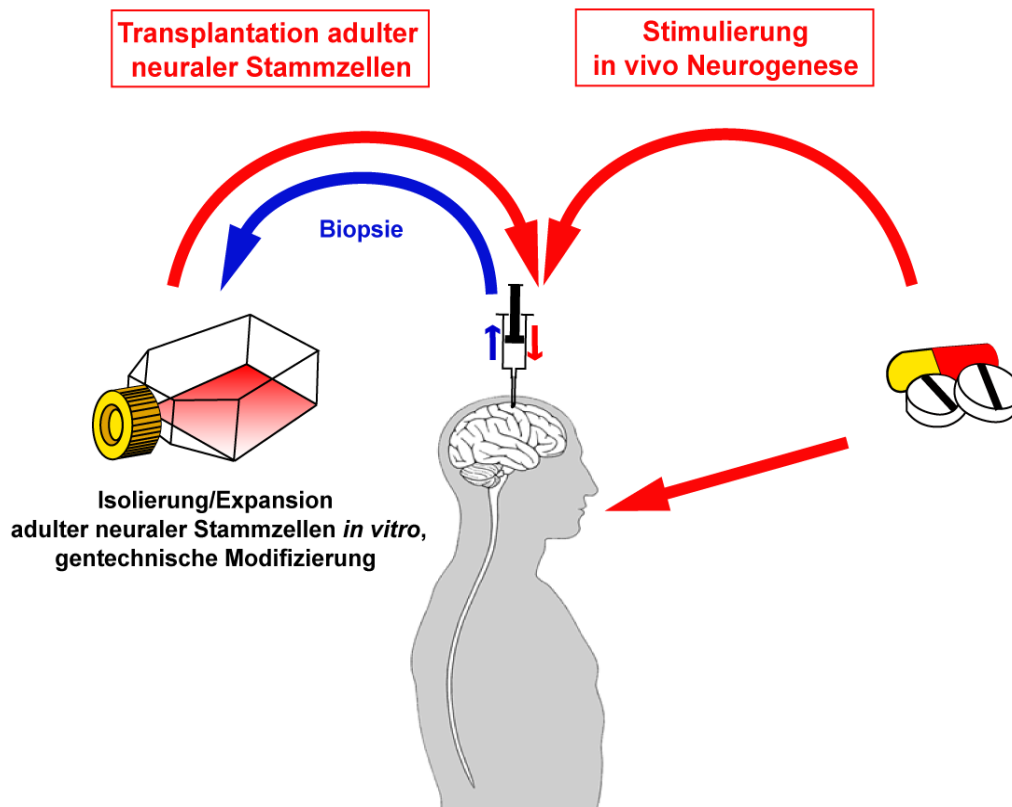


Abb.6. Strategien zur therapeutischen Nutzung neuraler Stammzellen (aus Aigner, L: Das regenerative Potential des adulten Zentralnervensystems, 2004)

Essentielle Voraussetzung zur erfolgreichen Nutzung neuraler Stammzellen ist das Wissen um die Regulationsmechanismen der Neurogenese sowie die Erforschung derjenigen Faktoren, die die Neurogenese modifizieren. Diese Arbeit versucht, mehrere Faktoren dahingehend zu untersuchen, ob sie Neurogenese zu beeinflussen vermögen. Dabei wird Neurogenese anhand der Proliferationsrate neuraler Vorläuferzellen, gemessen mittels Ki-67 und FACS-Analyse, wie auch anhand des Differenzierungsverhaltens der Vorläuferzellen bestimmt. Zur Untersuchung der Differenzierung kommen folgende Marker zum Einsatz: Nestin als Marker für neurale Vorläuferzellen,  $\beta$ 3-Tubulin zur Bestimmung des Anteils neuronaler Differenzierung und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), um den Anteil astroglialer Differenzierung zu ermitteln.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit also folgendes untersucht:

1. Der Effekt von artifiziellen Faktoren, wie fötalem Kälberserum und cAMP-erhöhenden Agenzien auf die Neurogenese und Differenzierung neuronaler Stamm- bzw. Vorläuferzellen, gemessen an den oben genannten Markern.
2. Der Einfluss der jeweiligen anatomischen Region, bzw. der Herkunft der neuronalen Stamm- bzw. Vorläuferzelle auf die Neurogenese und ggf. auf das Differenzierungspotential der Zellen.
3. Der Einfluss, den Transforming Growth Factor  $\beta_1$  auf die Proliferation und das Differenzierungsverhalten der neuronalen Stamm- bzw. Vorläuferzellen hat.

**B) Material und Methoden****I. Gewinnung der Stammzellen**

Zur Gewinnung der Stammzellen wurden die Hippocampi (HC), die Subventrikulärzonen (SVZ) sowie das cervikale und thorakale Rückenmark (SC) erwachsener Mäuse beider Geschlechter verwendet. Die jeweiligen Gewebe wurden keimarm aus den Gehirnen entfernt, in eisgekühltem Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (PANBiotech, Aidenbach, Deutschland) gesammelt und anschließend einmal mit DPBS gewaschen. Nach der Entfernung von restlichen Blutgefäßen und Meningen wurden die jeweiligen Gehirnteile auf Objektträgern mithilfe von Rasierklingen zerkleinert. Nach einem weiteren Waschschrift in DPBS wurden die Gewebe in PPD Lösung resuspendiert. Diese Lösung besteht aus 0,01% Papain (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, USA), 0,1% Dispase II (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland), 0,01% DNase I (Worthington Biochemicals) und 12,4 mmol/l  $\text{MgSO}_4$  gelöst in HBSS (PANBiotech) ohne  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  (PAA Laboratories, Pasching, Österreich). Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Suspension mittels einer 10 ml Pipette ca. 20 - 30mal auf- und abpipettiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit NB Medium (Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt durch B27 (Gibco BRL), 2 mmol/l L-Glutamin (PANBiotech) und 0,1 mg/l Penicillin/Streptomycin (PANBiotech) (à NB B27 not all). Zuletzt wurde die Zellsuspension in NB B27 not all mit 2 µg/ml Heparin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 20 ng/ml bFGF-2 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), sowie 20 ng/ml EGF (R&D Systems) (à NB B27 all) überführt.

## II. Zellkultur

Die Zellen wurden in NB B27 all in T25- bzw. T75- Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Nährmediums abpipettiert, die darin enthaltenen Zellen bei 800 rpm und 4°C fünf Minuten abzentrifugiert und mit frischem Nährmedium wieder in die Kulturflasche zurückgegeben. Sobald die Dichte der Zellen in der Kulturflasche zu hoch oder der Durchmesser der Neurosphären zu groß geworden war, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die alle Neurosphären aus der Flasche wie oben beschrieben abzentrifugiert, 10 min bei 37°C im Wasserbad mittels Accutase (PAA) die Zell-Zell- Verbindungen angedaut und schließlich durch auf- und abpipettieren gelöst. Die so entstandene Suspension aus Einzelzellen und zerkleinerten Neurosphären wurde anschließend, je nach Dichte der Zellen, im zwei- bis fünffachen des Ausgangsvolumens an Nährmedium wieder aufgenommen. Pro T25-Flasche wurden 5 ml, pro T75-Flasche 10 ml Nährmedium verwendet.

## III. Differenzierung der Zellen

Zur Differenzierung der neuronalen Stammzellen wurden mehrere Ansätze verwendet. Allen gemeinsam ist, dass die Zellen auf mit Poly-L-Ornithin (Sigma) und Laminin (Sigma) beschichteten Deckgläsern (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) als Zellmonolayer in der Dichte  $5 \times 10^4$  Zellen/ml in 12-well-Platten (TPP) differenziert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die 24 h in NB B27 all ausgesät wurden. Als eigentliche Differenzierungsansätze dienten:

1. NB B27 not all mit 1% fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, PANBiotech) à 1% FCS
2. NB B27 not all mit 5% FCS à 5% FCS

3. NB B27 not all mit 1% FCS, 100µmol/l db-cAMP (Sigma), 20 nmol/l Forskolin (Sigma), 25mmol/l KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) à CFK

Die Zellen wurden mit all diesen Ansätzen für 7 Tage behandelt.

#### **IV. Immunfluoreszenz**

Zur Immunfluoreszenzuntersuchung wurden die differenzierten Zellen bzw. die Negativansätze in 4% Formaldehydlösung bestehend aus Formaldehyd (Sigma-Aldrich, Deutschland) 4%, Sucrose (Merck) 0,05 mol/l in H<sub>2</sub>O dest. 15 min. bei Raumtemperatur fixiert, anschließend 3 x 5min. in TBS (Tris (Sigma), Borsäure (Merck), NaCl (Merck)) gewaschen und 2 Stunden mit Fischhautgelatinepuffer blockiert. Der Gelatinepuffer besteht aus 1% Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma), 0,2% Fischhautgelatine (Fish Skin Gelatine, Sigma) und 0,1% Triton X100 (Sigma) in TBS. Für Färbungen von Zellmembranbestandteilen (GalC, NG2) wurde der Puffer ohne Triton verwendet. Der primäre Antikörper wurde in Fischhautgelatinepuffer gelöst für 24 Stunden bei 4°C auf die Zellen gegeben. Es wurde stets eine Doppelfärbung vorgenommen. Als primäre Antikörper wurden verwendet (mit Verdünnungen): ms anti rat-Nestin (Chemicon, Temecula, USA) 1:200, rb anti S 100β (Swant, Bellinzona, Schweiz) (1:1000), ms anti β3-Tubulin (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 1:500, rb anti GFAP (Dako, Dänemark) 1:1000, gt anti DCX C18 (Santa Cruz Biotechnology, USA) (1:1000), ms anti MAP 2a+b (Sigma) (1:250), ms anti GalC (Chemicon, USA) 1:500, rb anti NG2 (Chemicon) (1:200), rb anti KI-67 (Novocastra, UK) 1:500.



Nach 3-maligem Waschen mit Fischhautgelatinepuffer bei Raumtemperatur für 10 min. wurde der sekundäre Antikörper für 4 Stunden auf die Zellen gegeben.

Als sekundäre Antikörper wurden verwendet (Hersteller in Klammern):

dk anti ms FITC (Dianova, Deutschland) 1:1000, dk anti ms grün Alexa fluor (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 1:1000,

dk anti gt FITC (Dianova, Deutschland) 1:1000, dk anti rb RHOX (Dianova, Deutschland) 1:1000.

Eine Färbung der Zellkerne erfolgte im Anschluß mit 4',6'-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid hydrat 0,25 µg/µl (DAPI; Sigma), ebenfalls in Fischhautgelatinepuffer, für 15 Minuten. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Deckgläser mithilfe von Flouromount G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) auf Objektträger der Firma Menzel Gläser (Superfrost Plus) aufgeklebt.

Folgende Tabelle zeigt die Antikörper, welche verwendet wurden:

<i><b>Antigen</b></i>	<i><b>Antikörper</b></i>	<i><b>Verdünnung</b></i>	<i><b>Zelltyp</b></i>
Nestin	mouse anti rat	1:200	Neurale Vorläuferzelle
S100β	rabbit anti	1:1000	Astrozyt
β3-Tubulin	mouse anti	1:500	Neuron
GFAP	rabbit anti	1:1000	Astrozyt
DCX C18	goat anti	1:1000	Neuronale Vorläuferzellen
MAP2a+b	mouse anti	1:250	Neuroblast + Neuron
GalC	mouse anti	1:500	Oligodendrozyt
NG2	rabbit anti	1:200	Gliale Vorläuferzelle
KI 67	rabbit anti	1:500	Proliferationsmarker

Tabelle 2: verwendete Antikörper, Verdünnung und Zelltyp

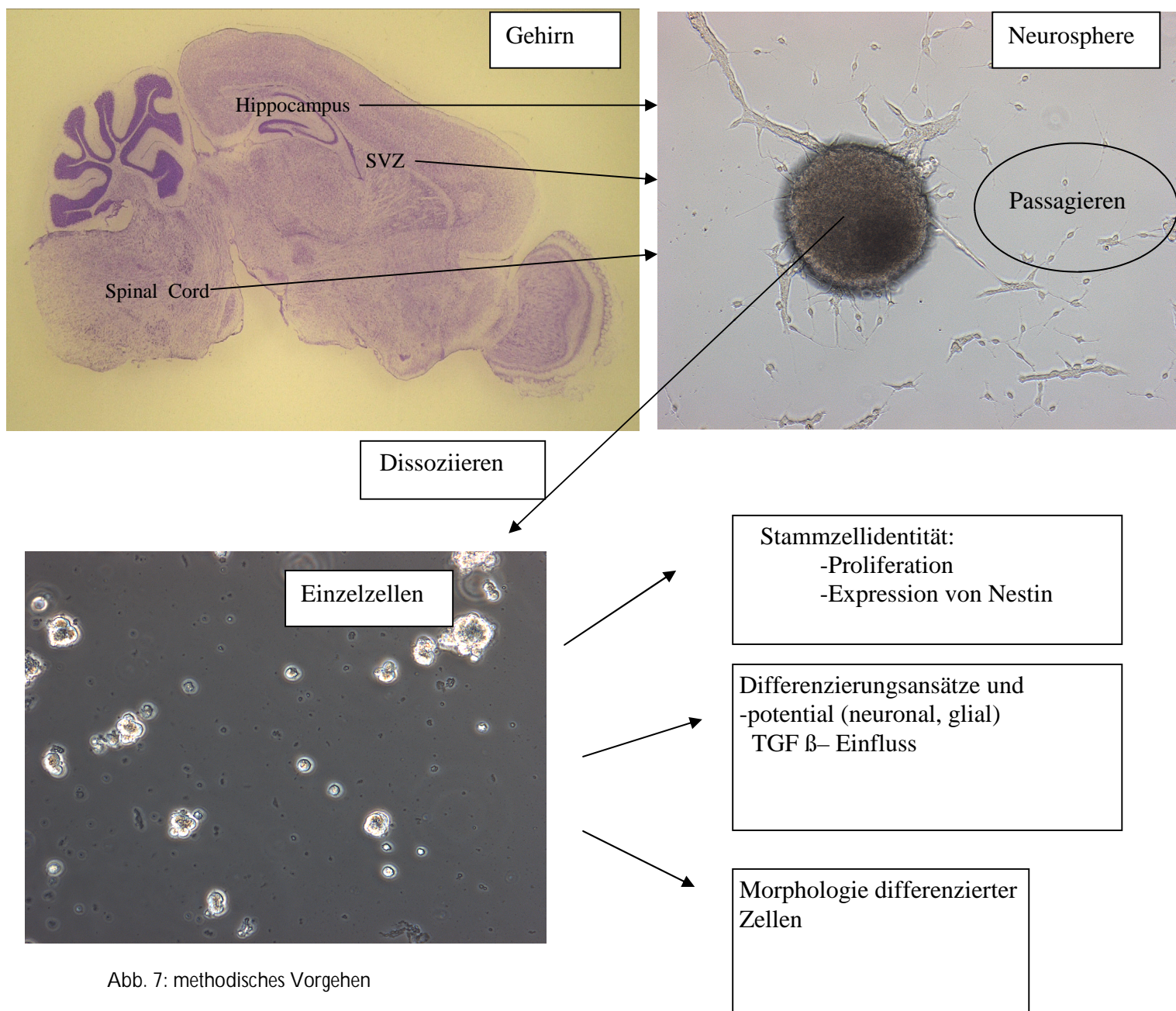
## **V. DNA-Färbung und FACS-Analyse**

Zur DNA-Färbung und FACS-Analyse wurden die Stammzell-Kulturen zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert. Hierzu wurde Accutase wie oben beschrieben verwendet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem Ethanol 70% resuspendiert und mindestens 24 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Vor der eigentlichen Färbung der DNA in 1 ml PBS mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid und 10  $\mu\text{g/ml}$  RNase für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgten zwei weitere Waschschrirte mit PBS. Nach der Inkubation erfolgte die Analyse mittels eines FACSCalibur flow cytometer der Firma Becton-Dickinson, Deutschland. Die Daten wurden bearbeitet mit der WinMDI 2.8 Software (J.Trotter, USA).

## **VI. Statistische Analyse**

Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt und aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Die Mittelwerte wurden dann mittels t-Test auf statistische Signifikanz geprüft (MedCalc® demoversion, ©Frank Schoonjans). Ein Unterschied wurde als signifikant gewertet, wenn  $P \leq 0,05$ .

Folgende Abbildung fasst das methodische Vorgehen noch einmal kurz zusammen:



## C) Ergebnisse

### I. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit vom artifiziellen externen Einfluss

Neurale Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Proliferation, durch die Expression bestimmter Marker (wie Nestin) und durch ihr Potential zur Differenzierung, einerseits in neuronale, andererseits in gliale Zellreihen, aus. Es wurde bereits für verschiedene Ansätze gezeigt, dass sie fähig sind, neurale Stammzellen ausdifferenzieren zu lassen. Ein systematischer Vergleich dieser Ansätze bezüglich Differenzierungspotential und Richtung der Differenzierung (neuronal versus glial) steht jedoch bisher aus. Es wurden also einige der verschiedenen Differenzierungsansätze hinsichtlich der oben genannten Kriterien untersucht.

#### *I.1. Expression von Nestin*

*Nestin ist ein sensibler Marker für adulte neurale Stammzellen. Im folgenden Kapitel sollen die Unterschiede in der Expression von Nestin und damit der Stammzellidentität der jeweiligen aus den unterschiedlichen Regionen des Gehirns gewonnenen Stammzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Differenzierungsansätzen gezeigt werden.*

##### *I.1.1. Subventrikulärzone*

Unbehandelte Zellen der Subventrikulärzone exprimieren zu  $81,94 \% \pm 7,82 \%$  Nestin. Der Anteil Nestin positiver Zellen sinkt durch Behandlung mit 1% fötalem Kälberserum (FCS) auf  $16,25 \% \pm 4,53 \%$  ( $P < 0,0001$ , 95%-Konfidenzintervall = 51,769 - 79,071). Verglichen mit unbehandelten Zellen exprimieren Zellen, die mit 5% FCS behandelt wurden, zu  $7 \% \pm 5,88 \%$  Nestin ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 67,122 - 82,758). Bei Zellen, die mit Forskolin, db-

cAMP, Kalium und 1% FCS behandelt wurden (CFK), fiel der Anteil Nestin positiver Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen auf  $25,06 \% \pm 16,67 \%$  ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 40,868 - 72,892). Während bezüglich Nestin weder ein signifikanter Unterschied zwischen 1% und 5% FCS ( $P = 0,0829$ , 95%-KI = -1,569 - 20,069), noch zwischen 1% FCS und CFK ( $P = 0,5363$ , 95%-KI = -31,456 - 49,076) besteht, steigt die Zahl Nestin positiver Zellen bei CFK-behandelten Zellen im Vergleich zu 5% FCS –behandelten Zellen signifikant an ( $P = 0,0279$ , 95%-KI = 2,517 - 33,603).

### *1.1.2. Rückenmark*

Zellen aus dem *Rückenmark* exprimieren in unbehandeltem Zustand zu  $81 \% \pm 11,15 \%$  Nestin, während sie unter 1% FCS nur noch zu  $2 \% \pm 1,67 \%$  Nestin positiv sind ( $P = 0,0007$ , 95%-KI = 55,695 - 102,305). Auch unter 5% FCS ( $3,45 \% \pm 1,67 \%$ ;  $P = 0,0008$ , 95%-KI = 54,245 - 100,855), sowie unter Cocktail ( $1 \% \pm 0,37 \%$ ;  $P = 0,0007$ , 95%-KI = 56,778 - 103,222) zeigen sich verglichen mit unbehandelten Zellen signifikante Rückgänge der Anzahl Nestin positiver Zellen. Nicht signifikant sind die Unterschiede zwischen 1% FCS und 5% FCS ( $P = 0,4768$ , 95%-KI = -5,735 - 8,635), sowie zwischen 5% FCS und Cocktail ( $P = 0,1801$ , 95%-KI = -2,754 - 7,654). Ebenso wenig signifikant ist der Unterschied zwischen 1% FCS und Cocktail ( $P = 0,4953$ , 95%-KI = -4,204 - 6,204).

### *1.1.3. Hippocampus*

Der Anteil Nestin positiver Zellen aus dem *Hippocampus* liegt bei unbehandelten Zellen bei  $53,5 \% \pm 12,1 \%$ . Behandlung mit 1% FCS lässt diesen Anteil auf  $7,54 \% \pm 3,63 \%$  sinken ( $P = 0,0155$ , 95%-KI = 16,619 - 75,301). 5% Serum bewirkt einen Rückgang des Anteils Nestin positiver Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen auf  $8,42 \% \pm 10,15 \%$  ( $P = 0,0078$ , 95%-KI = 19,763 - 70,397). Den stärksten Rückgang des Anteils Nestin positiver Zellen

bewirkt 1% FCS mit db-cAMP, Forskolin und Kalium. Darunter sinkt der Anteil Nestin positiver Zellen auf  $6,15 \% \pm 3,15 \%$  ( $P = 0,0028$ , 95%-KI = 27,307 - 67,393). Vergleicht man die Ergebnisse von 1% FCS und 5% FCS, so finden sich keine signifikanten Unterschiede ( $P = 0,9173$ , 95%-KI = -23,954 - 25,714). Auch zwischen 5% FCS und CFK bestehen keine signifikanten Unterschiede ( $P = 0,7302$ , 95%-KI = -14,766 - 19,306). Ebenso wenig zeigt der Vergleich zwischen 1% FCS und CFK signifikante Unterschiede ( $P = 0,6775$ , 95% - KI = -8,249 - 11,029).

Alle Differenzierungsansätze reduzieren den Anteil Nestin- positiver Zellen signifikant, bewirken also eine Differenzierung weg von der multipotenten Stamm- hin zu spezialisierten Parenchymzellen.



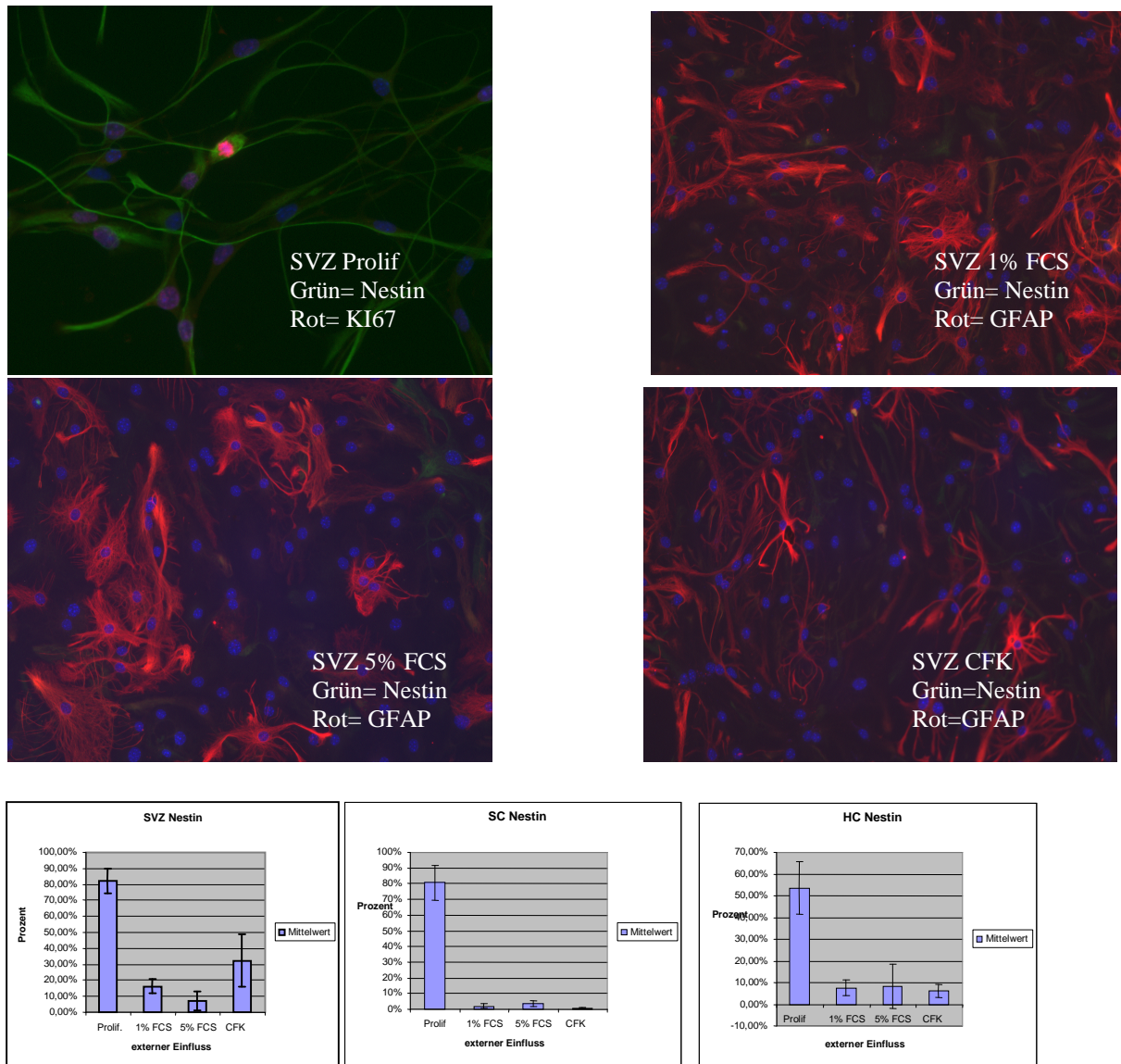


Abbildung 8: Anteil Nestin positiver Zellen aus der Subventrikulär-Zone, dem Rückenmark und dem Hippocampus in Abhängigkeit vom externen Einfluss

## I.2 Expression von KI-67

*KI 67 ist ein Proliferationsmarker, d.h. er färbt die Zellen im Gewebe an, die sich vermehren, die so genannte Wachstumsfraktion. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht.*

### I.2.1. Subventrikulärzone

Unbehandelte Vorläuferzellen aus der Subventrikulärzone weisen einen Anteil von 32,78 %  $\pm$  8,26 % an KI-67 positiven Zellen auf. Unter Behandlung mit 1% FCS exprimieren 0,57 %  $\pm$  0,33% KI-67 ( $P = 0,0025$ , 95%-KI = 18,959 - 45,461). Der Anteil KI-67 positiver Zellen unter 5% FCS liegt bei 1 %  $\pm$  1,14 % ( $P = 0,0027$ , 95%-KI = 18,484 - 45,216). Behandlung mit CFK resultiert in einem Anteil von 0,9 %  $\pm$  0,24 % KI-67 positiver Zellen ( $P = 0,0026$ , 95%-KI = 18,634 - 45,126). Es besteht weder zwischen 1% FCS und 5% FCS ( $P = 0,6271$ , 95%-KI = -1,542 - 2,262), noch zwischen 5% FCS und CFK ( $P = 0,9666$ , 95%-KI = -1,837 - 1,897), oder zwischen 1% FCS und CFK ( $P = 0,2339$ , 95%-KI = -0,324 - 0,984).

### I.2.2. Rückenmark

KI-67 wird in 30,03 %  $\pm$  8,97 % unbehandelter Zellen aus dem Rückenmark gefunden. Behandelt mit 1% FCS weisen noch 3,18 %  $\pm$  0,42 % KI-67 auf ( $P = 0,0278$ , 95%-KI = 5,561 - 48,139). Behandlung mit 5% FCS lässt den Anteil KI-67 positiver Zellen auf 3,10 %  $\pm$  0,82 % sinken ( $P = 0,0277$ , 95%-KI = 5,608 - 48,252). Auch Behandlung mit CFK resultiert in einem signifikant niedrigeren Anteil KI-67 positiver Zellen von 0,95 %  $\pm$  0,20 % ( $P = 0,0049$ , 95%-KI = 14,698 - 43,462). Vergleicht man 1% FCS und 5% FCS, so lässt sich kein



signifikanter Unterschied feststellen ( $P = 0,9135$ , 95%-KI = -2,723 - 2,883). Der Unterschied zwischen 5% FCS und CFK kann als signifikant bezeichnet werden ( $P = 0,0182$ , 95%-KI = 0,695 - 3,605). 1% FCS zeigt verglichen mit CFK einen signifikant höheren Anteil KI-67 positiver Zellen ( $P = 0,0036$ , 95%-KI = 1,381 - 3,079).

### *1.2.3. Hippocampus*

Unbehandelte Vorläuferzellen aus dem Hippocampus weisen einen Anteil von 26,20 %  $\pm$  1,96 % auf. Dieser Anteil sinkt bei Behandlung mit 1 % FCS auf 3,30 %  $\pm$  0,16 % ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 19,748 - 26,052). Behandlung mit 5% FCS lässt den Anteil KI positiver Zellen auf 0,01 %  $\pm$  0,001 % sinken ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 23,0482 - 29,3318). Der Anteil KI-67 positiver Zellen unter Behandlung mit CFK beträgt bei Zellen aus dem Hippocampus 2,65 %  $\pm$  0,20 % ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 20,392 - 26,708). Der Vergleich von 1% FCS und 5% FCS zeigt einen signifikanten Unterschied ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 3,0384 - 3,5516), ebenso wie der Vergleich zwischen 5% FCS und CFK ( $P < 0,0001$ , 95%-KI = 2,3243 - 2,9657). Vergleicht man 1% FCS und CFK, so lässt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied feststellen ( $P = 0,0117$ , 95%-KI = 0,239 - 1,061).

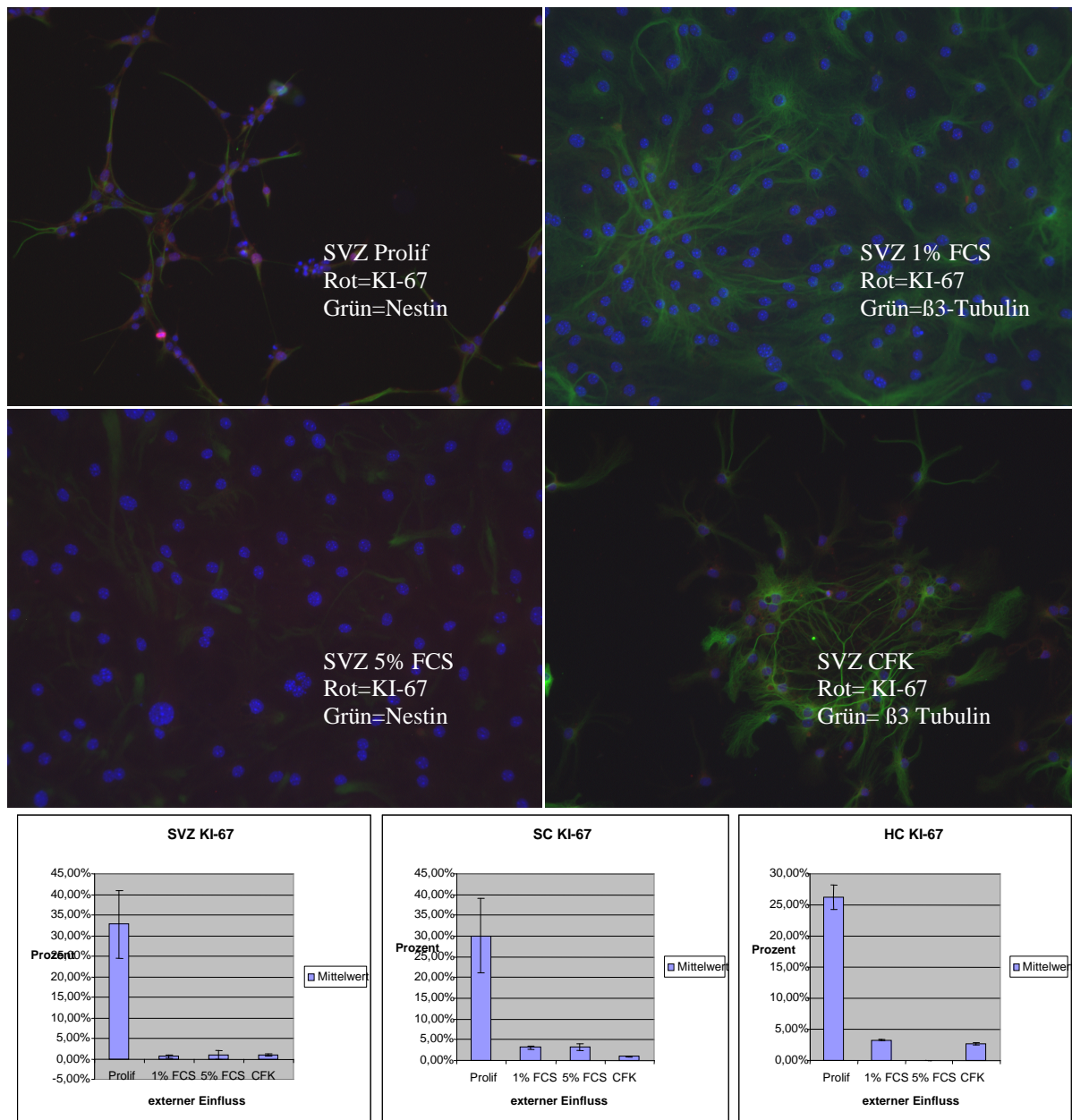


Abbildung 9: Anteil KI-67 positiver Zellen aus der Subventrikulärzone, dem Rückenmark und dem Hippocampus in Abhängigkeit vom externen Einfluss

Der bereits bei der Untersuchung der Expression von Nestin festgestellte Effekt der Differenzierungsmedien lässt sich bei der Bestimmung von KI-67 ebenfalls nachvollziehen. Alle Differenzierungsansätze reduzieren den Anteil KI-67 positiver Zellen signifikant. Die behandelten Stammzellen verlieren ihre Fähigkeit zur Proliferation, somit ihre Identität als Stammzellen.

### **I.3 Expression von $\beta$ 3-Tubulin**

*Tubulin ist der Hauptbestandteil von Mikrotubuli, welche eine Schlüsselrolle bei Mitose, intrazellulärem Transport und im Cytoskelett spielen.  $\beta$ 3- Tubulin, eine Unterform der Tubuline ist dabei spezifisch für Neurone.*

#### *I.3.1. Subventrikulärzone*

Unbehandelte Vorläuferzellen aus der Subventrikulärzone zeigen einen Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen von  $6,77 \% \pm 2,68 \%$ . Unter Behandlung mit 1% FCS zeigt sich ein Rückgang auf  $6 \% \pm 2,90 \%$  ( $P = 0,6868$ ; 95%-KI =  $-3,412 - 4,952$ ). Bei 5% FCS jedoch steigt der Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen auf  $22,53 \% \pm 8,16 \%$  ( $P = 0,0001$ ; 95%-KI =  $9,303 - 22,217$ ). Verglichen mit unbehandelten Zellen steigt der Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen unter CFK nur leicht auf  $7,86 \% \pm 4,52 \%$  ( $P = 0,6057$ ; 95%-KI =  $-3,468 - 5,648$ ). Verglichen mit 1% FCS steigt der Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen bei Behandlung mit 5% FCS signifikant an ( $P = 0,0074$ ; 95%-KI =  $5,519 - 27,541$ ). Zwischen 1% FCS und CFK besteht kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,5648$ ; 95%-KI =  $-5,9 - 9,62$ ). Der Vergleich zwischen 5% FCS und CFK ergibt einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0068$ ; 95%-KI =  $4,951 - 24,389$ ).

#### *I.3.2. Rückenmark*

Unbehandelte Zellen aus dem Rückenmark weisen zu  $6,86 \% \pm 2,23 \%$   $\beta$ 3-Tubulin auf. 1% FCS erhöht diesen Anteil auf  $11,10 \% \pm 4,06 \%$  ( $P = 0,0846$ ; 95%-KI =  $-0,753 - 9,233$ ). Behandlung mit 5% FCS resultiert in einem Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen von  $15,27 \% \pm 9,46 \%$  ( $P = 0,0924$ ; 95%-KI =  $-1,878 - 18,698$ ). CFK schließlich steigert den Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen auf  $17,17 \% \pm 9,04 \%$  ( $P = 0,0433$ ; 95%-KI =  $0,432 - 20,188$ ). Vergleicht man 1% FCS mit 5% FCS, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,5216$ ; 95%-KI =  $-12,332 - 20,672$ ). Ebenso wenig zeigt der Vergleich zwischen 1% FCS und CFK einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,3485$ ; 95%-KI =  $-9,815 -$

21,955). Ein Vergleich zwischen 5% FCS und CFK ergibt keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,8138$ ; 95%-KI = -19,075 - 22,875).

### *1.3.3. Hippocampus*

$\beta$ 3-Tubulin wird in 10,40 %  $\pm$  4,54 % unbehandelter Zellen aus dem Hippocampus gefunden. Behandelt mit 1% FCS weisen 17,85 %  $\pm$  4,00 % auf ( $P = 0,0999$ , 95%-KI = -2,249 - 17,149). Behandlung mit 5% FCS lässt den Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen auf 16,08 %  $\pm$  8,77 % steigen ( $P = 0,3755$ , 95%-KI = -10,15 - 21,51). Behandlung mit CFK resultiert in einem Abfall  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen auf einen Anteil von 6,48 %  $\pm$  2,42 % ( $P = 0,2574$ , 95%-KI = -4,327 - 2,167). Vergleicht man 1% FCS und 5% FCS, so lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $P = 0,7664$ , 95%-KI = -13,681 - 17,221). Der Unterschied zwischen 5% FCS und CFK kann nicht als signifikant bezeichnet werden ( $P = 0,1416$ , 95%-KI = -4,984 - 24,184). 1% FCS zeigt verglichen mit CFK einen signifikant höheren Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen ( $P = 0,0136$ , 95%-KI = 3,876 - 18,864).

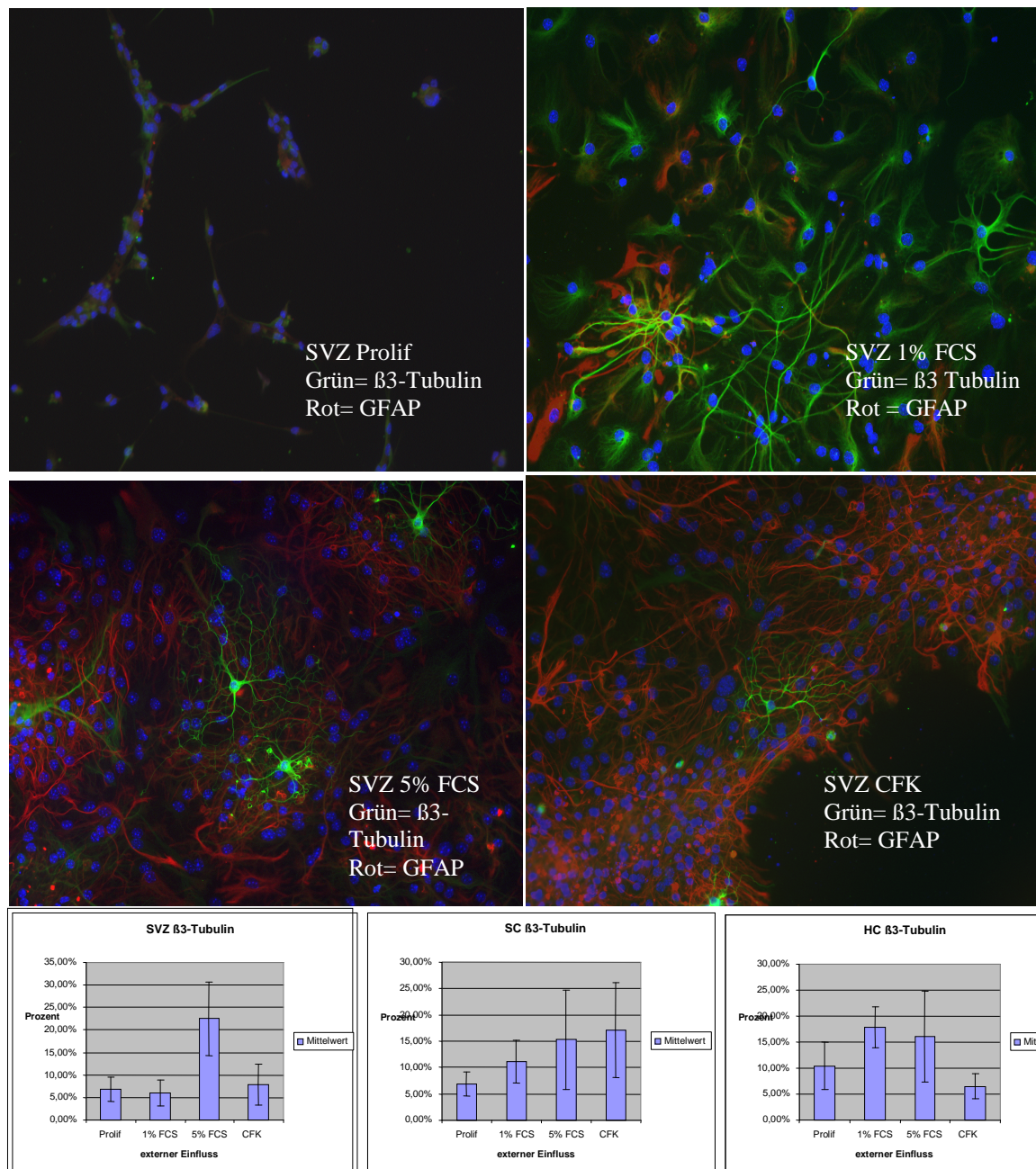


Abbildung 10: Anteil β3-Tubulin positiver Zellen aus der Subventrikulärzone, dem Rückenmark und dem Hippocampus in Abhängigkeit vom externen Einfluss

Nun zeigt sich das Ergebnis uneinheitlicher als bei Untersuchung der Stammzeleigenschaften. Die unterschiedlichen Differenzierungsansätze zeigen unterschiedliche Potenz zur neuronalen Differenzierung. Zudem ist der Effekt der Differenzierungsansätze deutlich abhängig von der neurogenen Region, aus welcher die Stammzellen gewonnen wurden. Dies wird im II. Kapitel genauer untersucht.



## I.4 Expression von GFAP

*GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein Protein, welches als Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen (vor allem Astrozyten) im Zentralnervensystem vorkommt.*

### I.4.1. Subventrikulärzone

Unbehandelte Zellen der Subventrikulärzone exprimieren zu  $14,30 \% \pm 7,58 \%$  GFAP. Unter 1% FCS sinkt dieser Wert auf  $9,30 \% \pm 5,59 \%$  ( $P = 0,3369$ ; 95%-KI = -6,353 - 16,353). Behandlung mit 5 % FCS bewirkt einen Anstieg von GFAP positiven Zellen auf  $17,56 \% \pm 6,03 \%$  ( $P = 0,3533$ ; 95%-KI = -4,023 - 10,543). Erhöhung intrazellulären cAMP's durch CFK schließlich lässt den Anteil GFAP positiver Zellen auf  $29,32 \% \pm 6,68 \%$  ( $P = 0,0183$ ; 95%-KI = 3,3 - 26,74) signifikant steigen. Der Vergleich zwischen 1% FCS und 5% FCS zeigt keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0637$ ; 95%-KI = -0,57 - 17,09). 1% FCS und CFK unterscheiden sich signifikant ( $P = 0,0164$ ; 95%-KI = 6,057 - 33,983). 5% FCS und CFK zeigen ebenfalls einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0169$ ; 95%-KI = 2,602 - 20,918).

### I.4.2. Rückenmark

Zellen ohne Behandlung aus dem Rückenmark weisen einen Anteil von  $6,11 \% \pm 2,15 \%$  GFAP positiver Zellen auf. Unter Einfluss von 1% FCS steigt dieser Anteil signifikant auf  $15,46 \% \pm 5,77 \%$  ( $P = 0,0229$ ; 95%-KI = 1,817 - 16,883). Behandlung mit 5% FCS resultiert in einem Anstieg auf  $11,80 \% \pm 4,41 \%$  ( $P = 0,0851$ ; 95%-KI = -1,249 - 12,629). CFK als Behandlung schließlich bewirkt einen signifikanten Anstieg auf  $18,50 \% \pm 2,45 \%$ . ( $P = 0,0030$ ; 95%-KI = 7,031 - 17,749). Der Vergleich von 1% FCS und 5% FCS zeigt keinerlei signifikanten Unterschied ( $P = 0,4823$ ; 95%-KI = -9,473 - 16,793). Vergleicht man 1% FCS mit CFK, so lässt sich ebenfalls kein

signifikanter Unterschied feststellen. ( $P = 0,5325$ ; 95%-KI = -9,331 - 15,411). Ebenso wenig zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen 5% FCS und CFK

( $P = 0,2011$ ; 95%-KI = -8,649 - 22,049).

#### *1.4.3. Hippocampus*

Zellen aus dem Hippocampus ohne externen Einfluss exprimieren zu  $7,88 \% \pm 5,33 \%$  GFAP. Wechselt der externe Einfluss zu 1% FCS, so steigt der Anteil GFAP positiver Zellen auf  $13,66 \% \pm 8,43 \%$  ( $P = 0,2905$ ; 95%-KI = -6,422 - 17,982). 5% FCS bewirkt einen Anstieg des Anteils GFAP positiver Zellen auf  $14 \% \pm 2,87 \%$  ( $P = 0,0897$ ; 95%-KI = -1,286 - 13,526). CFK als externer Einfluss bewirkt einen Anstieg auf  $14,80 \% \pm 6,29 \%$  ( $P = 0,1442$ ; 95%-KI = -3,167 - 17,007). Der Vergleich zwischen 1% FCS und 5% FCS zeigt keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,9416$ ; 95%-KI = -10,555 - 11,235). Ebenso wenig unterscheiden sich 1% FCS und CFK ( $P = 0,8356$ ; 95%-KI = -11,728 - 14,008). Der Unterschied zwischen 5% FCS und CFK kann ebenfalls nicht als signifikant bezeichnet werden ( $P = 0,8247$ ; 95%-KI = -7,659 - 9,259).

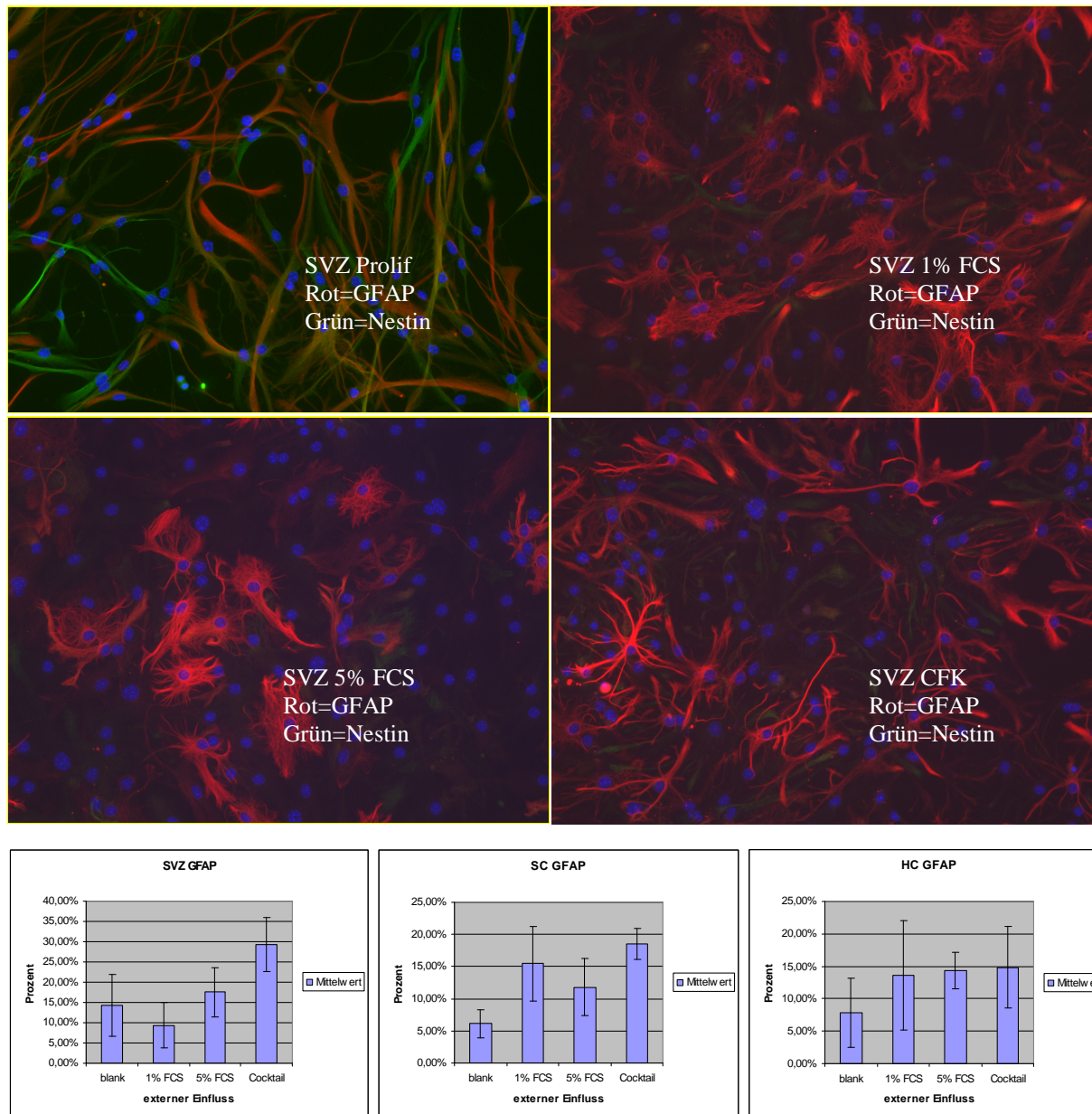


Abbildung 11: Anteil GFAP positiver Zellen aus der Subventrikulärzone, dem Hippocampus und dem Rückenmark in Abhängigkeit vom externen Einfluss

Auch bei der Potenz zur glialen Differenzierung zeigen unterschiedliche Differenzierungsansätze unterschiedliche Ergebnisse. Allen gleich ist eine signifikant erhöhte Anzahl glialer Zellen im Vergleich zum Proliferationsmedium (Ausnahme: FCS bei Zellen aus der Subventrikulärzone).



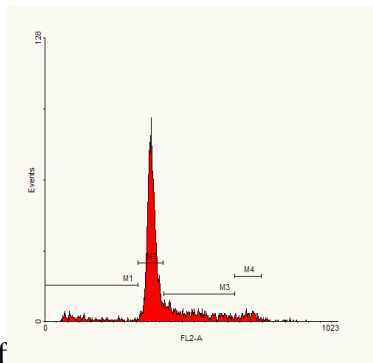
## **II. Die neurogene Region als Faktor der Neurogenese**

Neurale Stammzellen zeichnen sich durch Ihre Fähigkeit zur Proliferation und durch spezifische Antigene aus. Hier wurde mittels FACS-Analyse und Expression von KI-67 der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellpopulation untersucht. Als Marker für neurale Stammzellen wurde Nestin benutzt. Verglichen wird der Einfluss der neurogenen Region auf die Stammzellidentität. Des Weiteren wurde der Einfluss der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Differenzierungsansätze auf die Zellen aus den unterschiedlichen neurogenen Zonen untersucht.

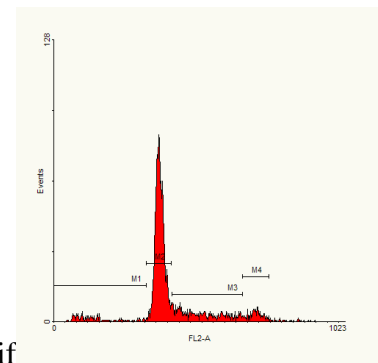
### **II.1. Proliferation**

Als Indikator der Proliferation wurden KI-67 und FACS-Analyse verwendet. Immunhistochemische Färbung mit KI-67-Antikörper ergab für unbehandelte Vorläuferzellen aus der Subventrikulärzone einen Anteil von  $32,78 \pm 8,26$  % KI-67 positive Zellen. Vorläuferzellen aus dem Rückenmark waren zu  $30,03 \pm 8,97$  % KI-67 positiv. Der Anteil KI-67 positiver Zellen aus dem Hippocampus war  $26,2 \pm 1,96$  %.

FACS-Analyse ergab für Zellen der Subventrikulärzone  $14,38 \pm 6,97$  % Zellen in S- und M-Phase des Zellzyklus. Zellen aus dem Rückenmark waren zu  $14,04 \pm 6,84$  % in S- und M-Phase. Hippocampuszellen wurden nicht mit FACS analysiert.



SVZ Prolif



SC Prolif

Diagramm II.1.: FACS-Ergebnisse aus der SVZ und dem SC

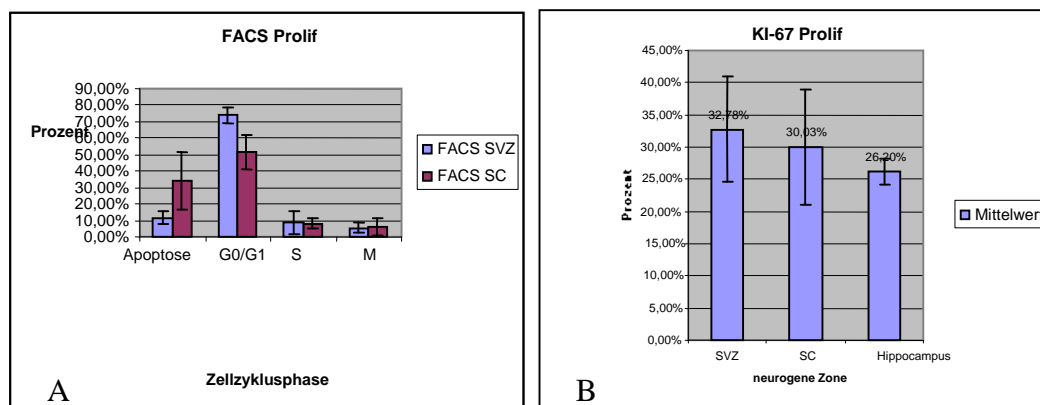


Abbildung 12: FACS-Analyse der Zellen aus SVZ und SC in Proliferations-Medium (A), sowie Expression von KI-67 in allen drei Regionen (B)

Aus allen drei untersuchten Regionen des Gehirns können KI-67 positive Zellen gewonnen werden; Zellen also, die proliferieren. Proliferation ist ein Merkmal von Stamm- und Vorläuferzellen. Es zeigen also sowohl die Subventrikulärzone, als auch das Rückenmark und der Hippocampus neurogene Potenz. Für die SVZ und das Rückenmark wurde dies zudem mittels FACS bestätigt.

## II.2. Expression von Nestin

Nestin wird spezifisch auf neuronalen Stammzellen exprimiert.

Unbehandelte Zellen der *Subventrikulärzone* exprimieren zu  $81,94 \% \pm 7,82 \%$  Nestin. Zellen aus dem *Rückenmark* exprimieren in unbehandeltem Zustand zu  $81 \% \pm 11,15 \%$  Nestin. Verglichen mit Zellen aus der Subventrikulärzone zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,8672$ ; 95%-KI = -11,272 - 13,152). Der Anteil Nestin positiver Zellen aus dem *Hippocampus* liegt bei

unbehandelten Zellen bei  $53,5 \% \pm 12,1 \%$ . Der Vergleich mit der SVZ zeigt hier einen durchaus signifikanten Unterschied ( $P = 0,0011$ ; 95%-KI = 14,734 - 42,146). Ebenso zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Rückenmark und dem Hippocampus ( $P = 0,0262$ ; 95%-KI = 4,845 - 50,155).

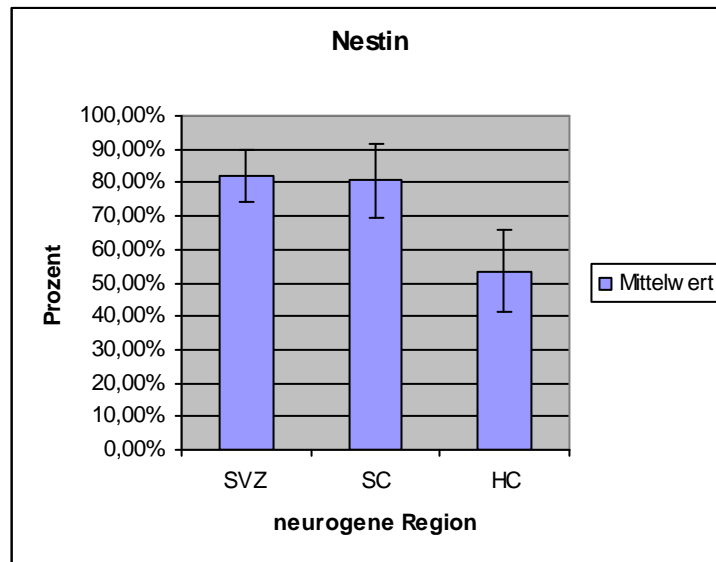


Abbildung 13: Expression von Nestin in Abhängigkeit von der neurogenen Region

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zellen aus allen drei Regionen die Merkmale neuraler Vorläuferzellen, also die Fähigkeit zur Proliferation und die Expression des spezifischen Stammzellmarkers Nestin, aufweisen.

### II.3. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit von der neurogenen Region als inhärentem Faktor

#### II.3.1. Expression von Nestin

##### II.3.1.1. Unbehandelte Zellen

vgl. C)I.2. Seite 14

**II.3.1.2. Behandlung mit 1% FCS**

Zellen aus der Subventrikulärzone, welche mit 1% FCS behandelt wurden, exprimieren Nestin in  $16,25 \% \pm 4,53 \%$ . Zellen aus dem Rückenmark, welche demselben Einfluss unterlagen, weisen einen Anteil Nestin positiver Zellen von  $2 \% \pm 1,67 \%$  auf. Dies stellt verglichen mit Zellen aus der Subventrikulärzone einen signifikanten Unterschied dar ( $P = 0,0069$ ; 95%-KI = 6,511 - 21,989). Der Vergleich zwischen Zellen aus dem Hippocampus, welche unter Einfluss von 1% FCS in  $7,54 \% \pm 3,63 \%$  Nestin exprimieren, mit Zellen aus der Ventrikulärzone zeigt keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0601$ ; 95%-KI = -0,595 - 18,015). Der Unterschied zwischen Zellen aus dem Rückenmark und dem Hippocampus kann ebenfalls nicht als signifikant bezeichnet werden.

**II.3.1.3. Behandlung mit 5% FCS**

Behandelt mit 5% FCS weisen Zellen aus der Subventrikulärzone einen Anteil von  $7 \% \pm 5,88 \%$  Nestin positiver Zellen auf. Zellen aus dem Rückenmark zeigen einen Anteil Nestin positiver Zellen von  $3,45 \% \pm 1,67 \%$ , welches sich nicht signifikant von Zellen aus der Subventrikulärzone unterscheidet ( $P = 0,3436$ ; 95%-KI = -4,483 - 11,583). Ebenfalls nicht signifikant unterscheiden sich Zellen aus dem Hippocampus und der Subventrikulärzone bezüglich des Anteils an Nestin, welcher beim Hippocampus  $8,42 \% \pm 10,15 \%$  beträgt ( $P = 0,7730$ ; 95%-KI = -9,386 - 12,226).

**II.3.1.4. Behandlung mit CFK**

Werden Zellen aus der Subventrikulärzone mit CFK behandelt, so weisen sie einen Anteil Nestin positiver Zellen von  $25,06 \% \pm 16,67 \%$  auf. Damit verglichen weisen Zellen aus dem Rückenmark bei selber Behandlung einen Anteil von  $1 \% \pm 0,37 \%$  auf, was statistisch keinem signifikanten Unterschied entspricht ( $P = 0,0668$ ; 95%-KI = -2,668 - 50,788). Zellen aus dem Hippocampus exprimieren zu  $6,15 \% \pm 3,15 \%$  Nestin. Verglichen mit dem

Ergebnis der Subventrikulärzone zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,1257$ ; 95%-KI = -8,285 - 46,105). Der Vergleich zwischen dem Rückenmark und dem Hippocampus zeigt einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,0482$ ; 95%-KI = 0,066 - 10,234).

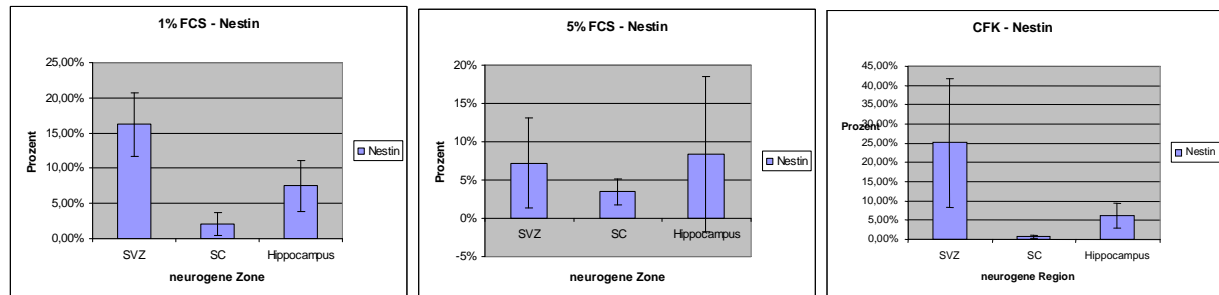


Abbildung 14: Expression von Nestin in Abhängigkeit von der neurogenen Region bei Behandlung mit 1% FCS, 5% FCS und CFK

Das Ansprechen der unterschiedlichen neurogenen Regionen auf die jeweiligen Differenzierungsmedien ist nicht einheitlich. Zellen aus dem Rückenmark verlieren ihre Stammzellidentität deutlich stärker als Zellen aus den beiden anderen neurogenen Regionen. Dieser Effekt zeigt sich unter allen drei untersuchten Differenzierungsmedien. Am stärksten behalten Zellen aus der Subventrikulärzone ihre Identität als Stammzellen.

### II.3.2. Expression von KI-67

#### II.3.2.1. Unbehandelte Zellen

siehe C) I.1. Seite 13

#### II.3.2.2. Behandlung mit 1% FCS

Zellen aus der Subventrikulärzone zeigen bei Behandlung mit 1% FCS einen Anteil KI-67 positiver Zellen von  $0,57 \% \pm 0,004 \%$ , Zellen aus dem Rückenmark einen von  $3,18 \% \pm 0,42 \%$ . Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar ( $P = 0,0004$ ; 95%-KI = 1,934 - 3,286). Der Vergleich von Zellen aus dem Hippocampus, welche einen Anteil von  $3,30 \% \pm 0,16 \%$  KI-67

positiver Zellen aufweisen, mit Zellen aus der Subventrikulärzone zeigt einen signifikanten Unterschied ( $P < 0,0001$ ; 95%-KI = 2,466 - 2,994), der mit Zellen aus dem Rückenmark nicht ( $P = 0,6678$ ; 95%-KI = -0,6 - 0,84).

#### **II.3.2.3. Behandlung mit 5% FCS**

Behandlung mit 5% FCS resultiert in einem Anteil KI-67 positiver Zellen von  $1 \% \pm 1,14 \%$  in Zellen aus der Subventrikulärzone. Dies ist nicht signifikant unterschiedlich zu Zellen aus dem Rückenmark, welche zu  $3,10 \% \pm 0,82 \%$  KI-67 exprimieren ( $P = 0,0607$ ; 95%-KI = -0,151 - 4,351). Zellen aus dem Hippocampus weisen unter 5% FCS einen Anteil KI-67 positiver Zellen von  $0 \% \pm 0,001 \%$  auf. Dies ist verglichen mit dem Ergebnis der Subventrikulärzone kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,2033$ ; 95%-KI = -0,8274 - 2,8274), verglichen mit dem Ergebnis des Rückenmarkes jedoch schon ( $P = 0,0028$ ; 95%-KI = 1,7856 - 4,4144).

#### **II.3.2.4. Behandlung mit CFK**

Der Anteil KI-67 positiver Zellen aus der Subventrikulärzone liegt unter Behandlung mit CFK bei  $0,90 \% \pm 0,24 \%$ . Diese Behandlung bewirkt bei Zellen aus dem Rückenmark einen Anteil KI-67 positiver Zellen von  $0,95 \% \pm 0,20 \%$  ( $P = 0,7954$ ; 95%-KI = -0,451 - 0,551). Zellen aus dem Hippocampus weisen bei Behandlung mit CFK einen Anteil KI-67 positiver Zellen von  $2,65 \% \pm 0,20 \%$  auf. Sowohl im Vergleich mit der Subventrikulärzone ( $P = 0,0006$ ; 95%-KI = 1,249 - 2,251), als auch mit dem Rückenmark ( $P = 0,0005$ ; 95%-KI = 1,247 - 2,153) zeigt sich hierbei ein signifikanter Unterschied.

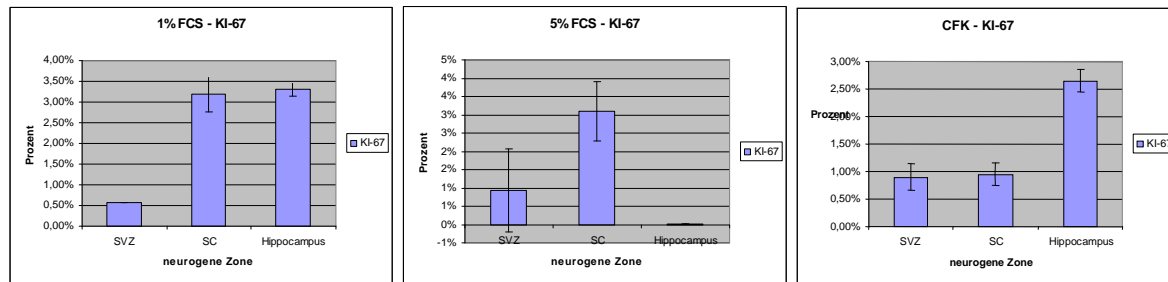


Abbildung 15: KI67-Expression in Abhängigkeit von der neurogenen Region unter 1% FCS, 5% FCS und CFK

Die hier erzielten Ergebnisse stehen in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen, welche unter II.3.1. erzielt wurden, da zum Teil die Expression von Nestin und KI-67, welches beides Marker für Vorläuferzellen sind, sich nicht einheitlich verhalten.

### II.3.3. Expression von $\beta$ 3-Tubulin

#### II.3.3.1. Unbehandelte Zellen

Bleiben Zellen aus der Subventrikulärzone unbehandelt, so exprimieren sie in  $6,77 \% \pm 2,68 \%$   $\beta$ 3-Tubulin. Zellen aus dem Rückenmark exprimieren  $\beta$ 3-Tubulin in  $6,68 \% \pm 2,23 \%$ , was verglichen mit dem Ergebnis der Subventrikulärzone kein signifikanter Unterschied ist ( $P = 0,9513$ ; 95%-KI = -3,079 - 3,259). Verglichen mit Zellen des Hippocampus, welche zu  $10,40 \% \pm 4,54 \%$   $\beta$ 3-Tubulin exprimieren, zeigt sich weder bei der Subventrikulärzone ( $P = 0,1071$ ; 95%-KI = -0,939 - 8,199), noch beim Rückenmark ( $P = 0,1486$ ; 95%-KI = -1,7 - 9,14) ein signifikanter Unterschied.

#### II.3.3.2. Behandlung mit 1% FCS

Behandlung mit 1 % FCS resultiert bei Zellen aus der SVZ in einem Anteil  $\beta$ -Tubulin positiver Zellen von  $6,0 \% \pm 2,90 \%$ . Demgegenüber exprimieren Zellen aus dem Rückenmark unter 1 % FCS  $\beta$ 3-Tubulin in  $11,10 \% \pm 4,06 \%$ . Sie unterscheiden sich damit nicht signifikant von Zellen aus der Subventrikulärzone ( $P = 0,1261$ ; 95%-KI = -2,048 - 12,248).

Hippocampuszellen unter dem Einfluss von 1 % FCS zeigen einen Anteil von  $17,85 \% \pm 4,00 \%$ , was zwar einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Subventrikulärzone ( $P = 0,0076$ ; 95%-KI = 4,781 - 18,919) bedeutet, nicht aber mit dem Rückenmark ( $P = 0,0795$ ; 95%-KI = -1,151 - 14,651).

#### **II.3.3.3. Behandlung mit 5 % FCS**

Der Anteil  $\beta 3$ -Tubulin positiver Zellen unter Behandlung mit 5% FCS liegt bei  $22,53 \% \pm 8,16 \%$ . Im Vergleich dazu liegt der Anteil  $\beta 3$ -Tubulin positiver Zellen bei Rückenmarkszellen unter derselben Behandlung bei  $15,27 \% \pm 9,46 \%$  ( $P = 0,2258$ ; 95%-KI = -5,271 - 19,791). Behandelt man Zellen aus dem Hippocampus mit 5 % FCS, so zeigt sich ein Anteil  $\beta 3$ -Tubulin positiver Zellen von  $16,08 \% \pm 8,77 \%$ . Dies stellt weder beim Vergleich mit Zellen aus der Subventrikulärzone ( $P = 0,2240$ ; 95%-KI = -4,569 - 17,469), noch beim Vergleich mit Zellen des Rückenmarkes ( $P = 0,9113$ ; 95%-KI = -16,963 - 18,583) einen signifikanten Unterschied dar.

#### **II.3.3.4. Behandlung mit CFK**

CFK bewirkt in Zellen aus der Subventrikulärzone einen Anteil  $\beta 3$ -Tubulin positiver Zellen von  $7,68 \% \pm 4,52 \%$ . Zellen aus dem Rückenmark zeigen bei dieser Behandlung einen Anteil  $\beta 3$ -Tubulin positiver Zellen von  $17,17 \% \pm 9,04 \%$  ( $P = 0,1230$ ; 95%-KI = -3,673 - 22,653). Hippocampuszellen exprimieren unter Einfluss von CFK zu  $6,84 \% \pm 2,42 \%$   $\beta 3$ -Tubulin. Verglichen mit der SVZ stellt dies keinen signifikanten Unterschied dar ( $P = 0,7543$ ; 95%-KI = -5,433 - 7,113). Ebenfalls nicht signifikant fällt der Vergleich mit dem Rückenmark aus ( $P = 0,0745$ ; 95%-KI = -1,483 bis 22,143).



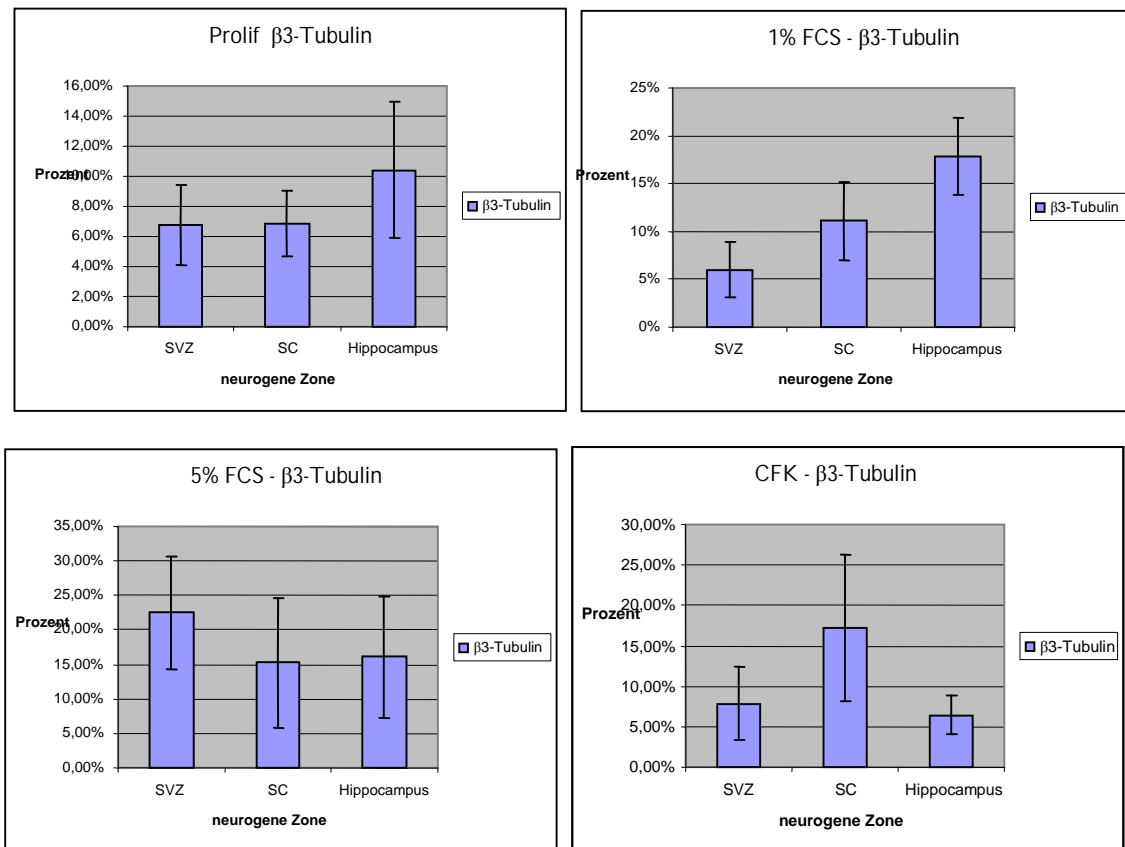


Abbildung 16: Expression von  $\beta 3$ -Tubulin in Abhängigkeit von der neurogenen Zone unter Einfluss von 1% FCS, 5% FCS und CFK

#### II.3.4. Expression von GFAP

##### II.3.4.1. Unbehandelte Zellen

Ohne Behandlung weisen Zellen aus der Subventrikulärzone einen Anteil GFAP positiver Zellen von  $14,30 \% \pm 7,58 \%$  auf. Rückenmarkszellen erweisen sich in  $6,11 \% \pm 2,15 \%$  als GFAP positiv ( $P = 0,0684$ ; 95%-KI =  $-0,76 - 17,14$ ), Hippocampuszellen in  $7,88 \% \pm 5,33 \%$ . Es zeigt sich also auch kein signifikanter Unterschied zwischen Hippocampus und SVZ ( $P = 0,1725$ ; 95%-KI =  $-3,38 - 16,22$ ) oder zwischen Hippocampus und Rückenmark ( $P = 0,5606$ ; 95%-KI =  $-5,262 - 8,802$ ).

**II.3.4.2. Behandlung mit 1% FCS**

Behandlung mit 1% FCS resultiert in Zellen aus der Subventrikulärzone in einem Anteil GFAP positiver Zellen von  $9,30 \% \pm 5,59 \%$ . Rückenmarkszellen weisen bei dieser Behandlung einen Anteil von  $15,46 \% \pm 5,77 \%$  GFAP positive Zellen auf ( $P = 0,2161$ ; 95%-KI = -5,028 - 17,348). Hippocampuszellen unter dem Einfluss von 1% FCS zeigen in  $13,66 \% \pm 8,43 \%$  GFAP positive Zellen. Wiederum unterscheiden sie sich hier weder signifikant von Zellen aus der SVZ ( $P = 0,4767$ ; 95%-KI = -10,219 - 18,939), noch von Rückenmarkszellen ( $P = 0,7366$ ; 95%-KI = -10,698 - 14,298).

**II.3.4.3. Behandlung mit 5% FCS**

Werden Zellen aus der SVZ mit 5% FCS behandelt, so exprimieren sie in  $17,56 \% \pm 6,03 \%$  GFAP. Zellen aus dem Rückenmark tun dies bei selber Behandlung in  $11,80 \% \pm 4,41 \%$  ( $P = 0,1214$ ; 95%-KI = -2,05 - 15,01). Hippocampuszellen schließlich weisen einen Anteil GFAP positiver Zellen unter o.g. Behandlung von  $14 \% \pm 2,87 \%$ . Im Vergleich zeigt sich auch hier wiederum kein signifikanter Unterschied zur Subventrikulärzone ( $P = 0,2923$ ; 95%-KI = -3,524 - 10,644) oder zum Rückenmark ( $P = 0,4560$ ; 95%-KI = -4,803 - 9,203).

**II.3.4.4. Behandlung mit CFK**

CFK bewirkt in Zellen aus der SVZ eine Expression von GFAP in  $29,32 \% \pm 6,68 \%$ . Zellen aus dem Rückenmark exprimieren unter CFK in  $18,50 \% \pm 2,45 \%$  GFAP. Hippocampuszellen, behandelt mit CFK, zeigen in  $14,80 \% \pm 6,29 \%$  Expression von GFAP. Kein signifikanter Unterschied zeigt sich im Vergleich von SVZ und Rückenmark ( $P = 0,1261$ ; 95%-KI = -5,55 - 27,19). Dagegen ist ein signifikanter Unterschied festzustellen beim Vergleich von Hippocampus und SVZ ( $P = 0,0320$ ; 95%-KI = 1,859 - 27,181). Der Unterschied zwischen Rückenmark und Hippocampus kann nicht als signifikant angesprochen werden ( $P = 0,3869$ ; 95%-KI = -6,338 - 13,738).

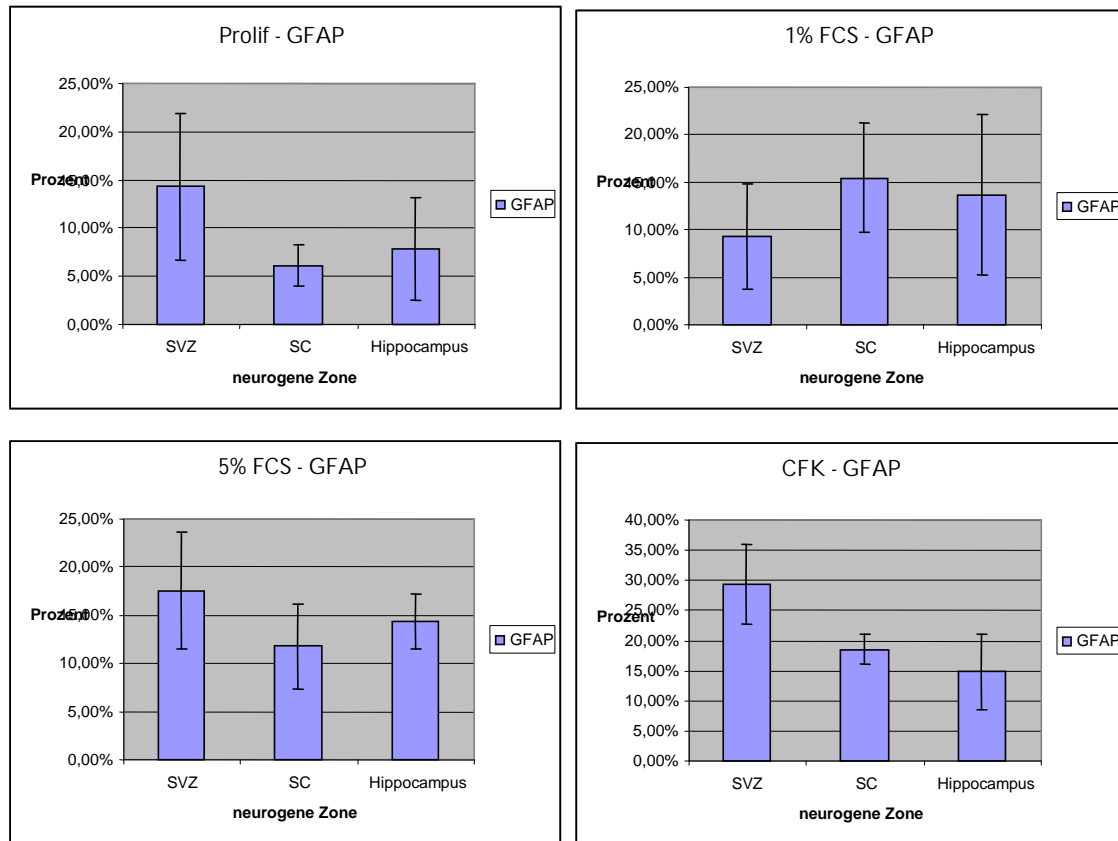


Abbildung 17: Expression von GFAP in Abhängigkeit von der neurogenen Zone unter Behandlung mit 1% FCS, 5% FCS und CFK

Zusammenfassend zeigen sich bei Vergleich der neurogenen Regionen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede. Alle untersuchten Regionen zeigen Proliferation und Expression von Nestin, somit Zeichen der Neurogenese, in vergleichbarem Umfang. Im Differenzierungsverhalten unterscheiden sich die einzelnen Regionen z. T. in signifikantem Ausmaß. Dies wird besonders bei Betrachten der Stammzellidentität und Verlust derselben unter Differenzierungsbedingungen deutlich.

### III. Änderung der Morphologie

Da sich bei Betrachtung der Morphologie der differenzierten Zellen gewisse wiederkehrende Unterschiede zeigten, wurde versucht, diese Unterschiede statistisch zu erfassen. Hierzu wurde die Anzahl der Neuriten unter der Bedingung 5% FCS und CFK bei Zellen aus der SVZ, dem Hippocampus und dem Rückenmark bestimmt.

#### III.1. Morphologie in Abhängigkeit von der Herkunft der Stammzellen

##### *III.1.1. Zellen aus der Subventrikulärzone*

Zellen aus der Subventrikulärzone weisen unter Behandlung mit 5% FCS durchschnittlich  $7,33 \pm 2,66$  Neuriten auf. Unter Einfluss von CFK sinkt dieser Wert auf  $3,38 \pm 1,45$  ( $P < 0,0001$ ; 95%-KI = 2,532 - 5,368).

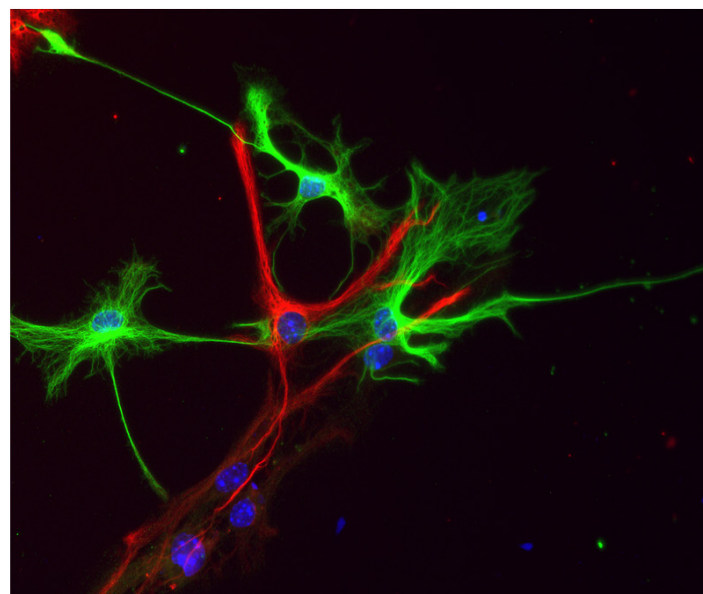
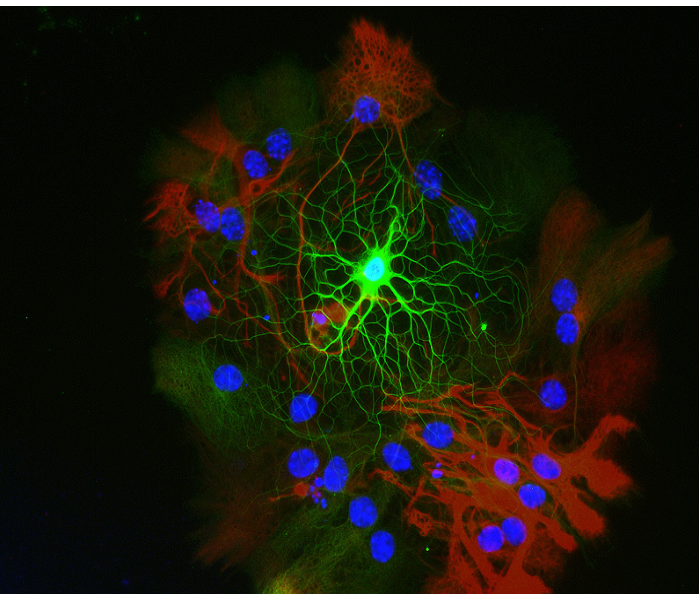


Abbildung 18.:Hauptsächliche Morphologie der SVZ- Zellen unter Einfluss von 5% FCS (links) und CFK (rechts).  
grün=  $\beta 3$ -Tubulin, rot= GFAP



*III.1.2. Zellen aus dem Rückenmark*

Zellen aus dem Rückenmark weisen unter Einfluss von 5% FCS  $3,62 \pm 2,23$  Neuriten auf. Werden sie mit CFK behandelt, so steigt dieser Wert auf  $5,38 \pm 2,26$  Neuriten ( $P = 0,0240$ ; 95%-KI = 0,246 - 3,274).

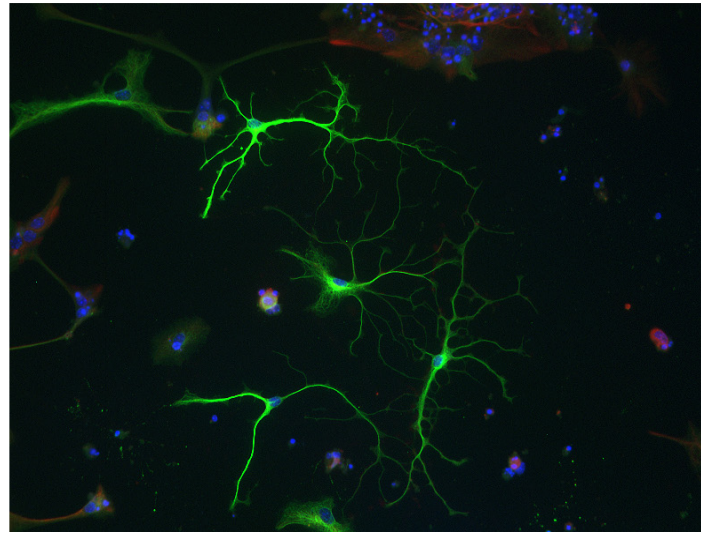
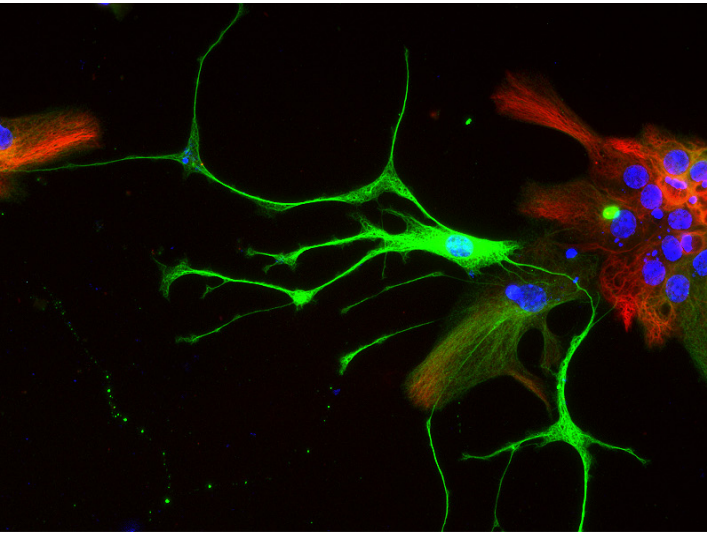


Abbildung 20.: Hauptsächlich Morphologie der Rückenmarkszellen unter Einfluss von 5% FCS (links) und CFK (rechts). Grün=β3-Tubulin, rot= GFAP

*III.1.3. Zellen aus dem Hippocampus*

Unter 5% FCS weisen Zellen aus dem Hippocampus  $4,71 \pm 2,76$  Neuriten auf, unter dem Einfluss von CFK  $6 \pm 0,71$  Neuriten ( $P = 0,3775$ ; 95%-KI = -1,723 - 4,303).

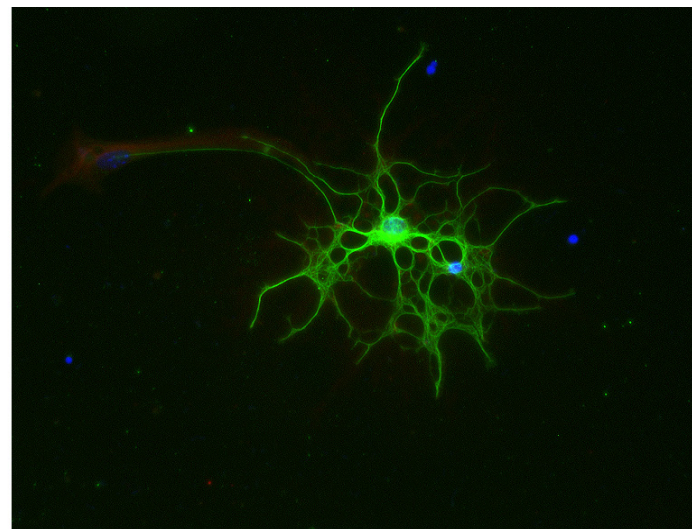
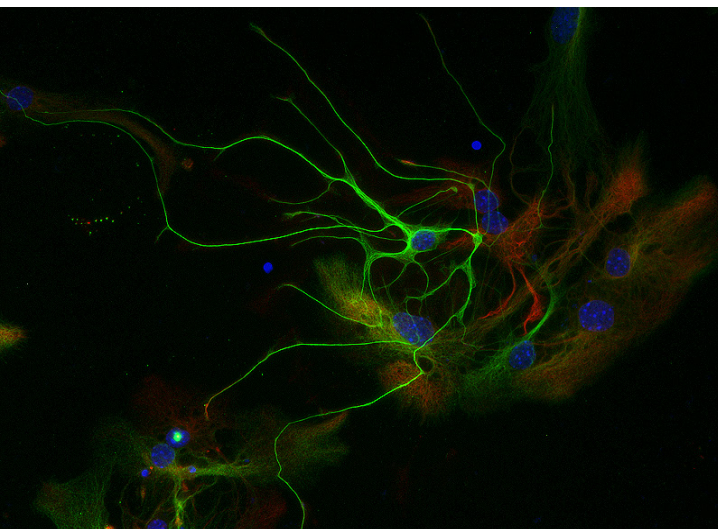


Abbildung 19: Hauptsächlich Morphologie der Hippocampuszellen unter Einfluss von 5% FCS (links) und CFK (rechts). Grün=β3-Tubulin, rot= GFAP

### III.2. Änderung der Morphologie in Abhängigkeit vom externen Einfluss

#### III.2.1. 5% FCS

Unter 5% FCS zeigen Zellen aus der SVZ durchschnittlich  $7,33 \pm 2,66$  Neuriten, Zellen aus dem Rückenmark weisen im Durchschnitt  $3,62 \pm 2,23$  Neuriten auf und Zellen aus dem Hippocampus haben durchschnittlich  $4,71 \pm 2,76$  Neuriten bei Behandlung mit 5% FCS. Verglichen mit Zellen aus der Subventrikulärzone zeigen Zellen aus dem Rückenmark signifikant weniger Neuriten ( $P < 0,0001$ ; 95%-KI = 2,194 - 5,226), ebenso wie Zellen aus dem Hippocampus ( $P = 0,0029$ ; 95%-KI = 0,94 - 4,3). Der Vergleich zwischen Rückenmark- und Hippocampuszellen zeigt keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,2417$ ; 95%-KI = -0,777 - 2,957).

#### III.2.2. CFK

Behandelt man Zellen aus der SVZ mit CFK, so findet man durchschnittlich  $3,38 \pm 1,45$  Neuriten pro Zelle. Zellen aus dem Rückenmark weisen unter derselben Behandlung  $5,38 \pm 2,26$  Neuriten auf. Hippocampuszellen schließlich entwickeln unter CFK durchschnittlich  $6 \pm 0,71$  Neuriten. Der Vergleich zwischen SVZ und SC zeigt auch hier einen signifikanten Unterschied ( $P = 0,004$ ; 95%-KI = 0,683 - 3,317). Vergleicht man Zellen aus dem Rückenmark mit Hippocampuszellen, so zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $P = 0,0028$ ; 95%-KI = 1,029 - 4,211). Der Vergleich zwischen Rückenmark- und Hippocampuszellen zeigt auch bei Behandlung mit CFK keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,5976$ ; 95%-KI = -1,776 - 3,016).

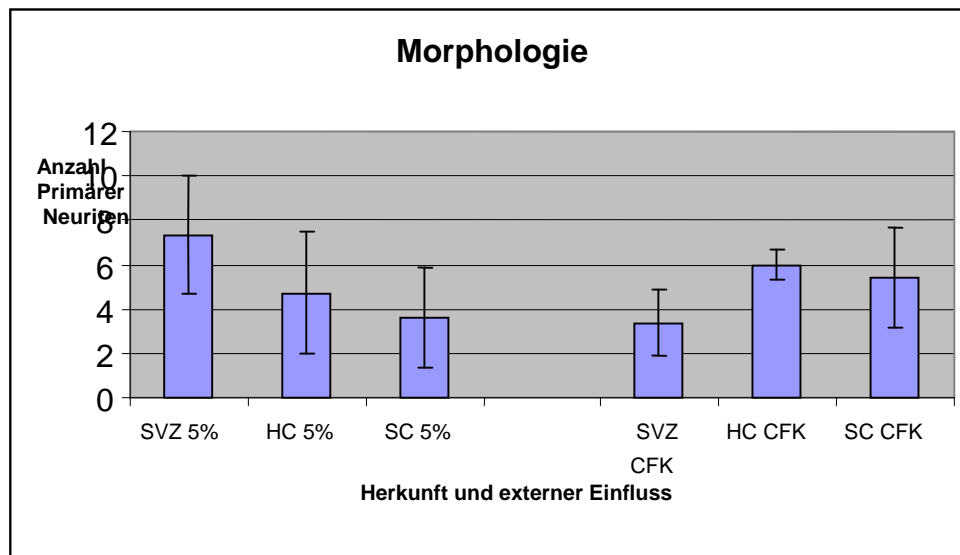


Abbildung 21.: Anzahl der primären Neuriten in Abhängigkeit von Herkunft und externem Einfluss

#### **IV. Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit von TGF $\beta$ als physiologischem Faktor**

TGF  $\beta_1$  hat verschiedene Auswirkungen auf Zellen des ZNS. Hier sollte die Beeinflussung der Neurogenese, quantitativ wie qualitativ, untersucht werden. Um noch genauer die verschiedenen Entitäten der differenzierten Vorläuferzellen untersuchen zu können, wurde ein leicht abgewandeltes Set von Markern verwendet. Vor allem um gliale Zellen noch weiter differenzieren zu können, wurden zusätzlich zu GFAP noch NG2 und Gal C bestimmt. TGF-Rezeptor II, der TGF- bindende Anteil der TGF- Rezeptors, wurde bestimmt, um eine Up- bzw. Downregulation dieses Rezeptors in differenzierten Zellen zu überprüfen.

##### **IV.1. Expression von Nestin**

###### *IV.1.1. Proliferationsmedium*

Vorläuferzellen unter Proliferationsbedingungen aus der Subventrikulärzone der Maus exprimieren ohne TGF  $\beta_1$  in 81,17 %  $\pm$  6,89 % Nestin, während diese Zellen unter Einfluss von TGF  $\beta_1$  in 78,17 %  $\pm$  12,45 % Nestin positiv sind (P = 0,7251; 95%-KI= -19,709 - 25,909).

###### *IV.1.2. Behandlung mit 5% FCS*

Unter Einfluss von 5% FCS exprimieren Zellen aus der SVZ der Maus in 6,42 %  $\pm$  1,1 % Nestin. Zellen unter dem Einfluss von TGF  $\beta_1$  exprimieren bei Behandlung mit 5% FCS in 10, 93 %  $\pm$  5,14 % Nestin (P = 0,2114; 95%-KI= - 3,916 - 12,936).



## IV.2. Expression von $\beta$ 3-Tubulin

### IV.2.1. Proliferationsmedium

Im Proliferationsmedium sind Zellen aus der SVZ der Maus zu  $9,17 \% \pm 2,9 \%$   $\beta$ 3-Tubulin positiv. Wurden sie vorher mit TGF  $\beta_1$  behandelt, so liegt dieser Anteil bei  $13,1 \% \pm 1,13 \%$  ( $P = 0,0940$ ; 95%-KI=  $-1,059 - 8,919$ ).

### IV.2.2. Behandlung mit 5% FCS

Zellen aus der SVZ der Maus zeigen, wenn sie mit 5% FCS behandelt werden, einen Anteil von  $32,53 \% \pm 1,25 \%$  an  $\beta$ 3-Tubulin positiven Zellen. Unter Einfluss von TGF  $\beta_1$  liegt der Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen bei  $30,5 \% \pm 3,11 \%$  ( $P = 0,3534$ ; 95%-KI=  $-3,343 - 7,403$ ).

## IV.3 Expression von GFAP

### IV.3.1. Proliferationsmedium

Ohne Differenzierungsmedien exprimieren Zellen aus der Maus-SVZ in  $13,17 \% \pm 3,43 \%$  GFAP. Der Einfluss von TGF  $\beta_1$  resultiert in einem Anteil GFAP positiver Zellen von  $19,67 \% \pm 5,74 \%$  ( $P = 0,1675$ ; 95%-KI=  $-4,219 - 17,219$ ).

### IV.3.2. Behandlung mit 5% FCS

Ohne TGF  $\beta_1$  zeigen Zellen aus der SVZ der Maus bei Behandlung mit 5% FCS einen Anteil GFAP positiver Zellen von  $21,65 \% \pm 2,90 \%$ . Unter dem zusätzlichen Einfluss von TGF  $\beta_1$  liegt dieser Anteil bei  $18,27 \% \pm 3,58 \%$  ( $P = 0,2727$ ; 95%-KI=  $-4,005 - 10,765$ ).

#### IV.4. Expression von NG2

##### *IV.4.1 Proliferationsmedium*

Der Anteil NG2 positiver Zellen bei Zellen aus der SVZ der Maus liegt bei  $19,57 \% \pm 5,35 \%$ . Unter dem Einfluss von TGF  $\beta_1$  liegt der Anteil NG2 positiver Zellen bei  $22,2 \% \pm 7,10 \%$  ( $P = 0,6354$ ; 95%-KI= -11,621 - 16,881).

##### *IV.4.2. Behandlung mit 5% FCS*

Unter Behandlung mit 5% FCS alleine zeigen SVZ-Zellen der Maus in  $12,17 \% \pm 1,53 \%$  NG2. Der Einfluss von sowohl 5% FCS als auch TGF  $\beta_1$  resultiert in einem Anteil NG2 positiver Zellen von  $15,0 \% \pm 2,30 \%$  ( $P = 0,1507$ ; 95%-KI= -1,598 - 7,258).

#### IV.5. Expression von GalC

##### *IV.5.1. Proliferationsmedium*

Ohne den Einfluss von TGF  $\beta_1$  zeigen Zellen aus der SVZ der Maus in  $0,56 \% \pm 0,61 \%$  GalC. Der Einfluss von TGF  $\beta_1$  resultiert in einem Anteil von  $0,31 \% \pm 0,31 \%$  GalC positiver Zellen ( $P = 0,5612$ ; 95%-KI= -0,847 - 1,347).

##### *IV.5.2. Behandlung mit 5% FCS*

Die Behandlung mit 5% FCS zeigt in Zellen aus der SVZ der Maus ohne TGF  $\beta_1$  als Ergebnis einen Anteil GalC positiver Zellen von  $3,62 \% \pm 0,26 \%$ . Mit TGF  $\beta_1$  zeigt sich ein Anteil von  $1,75 \% \pm 0,77 \%$  ( $P = 0,0163$ ; 95%-KI= 0,567 - 3,173). Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar.

## IV.6. Expression von TGF-Rezeptor II

### IV.6.1. Proliferationsmedium

Bezüglich TGF Rezeptor II zeigen unbehandelte Zellen aus der SVZ der Maus einen Anteil von  $82,39 \% \pm 15,03 \%$ . Unter Einfluss von TGF  $\beta_1$  zeigt sich ein Anteil TGFR II positiver Zellen von  $75,43 \% \pm 17,47 \%$  ( $P = 0,6285$ ; 95%-KI = -29,982 - 43,902).

### IV.6.2. Behandlung mit 5% FCS

Während Zellen ohne Einfluss von TGF  $\beta_1$  einen Anteil von  $17,53\% \pm 7,68\%$  aufweisen, ändert sich dieser Wert auf  $11,88\% \pm 4,4\%$  ( $P = 0,3309$ ; 95%-KI = -8,538 – 19,838).

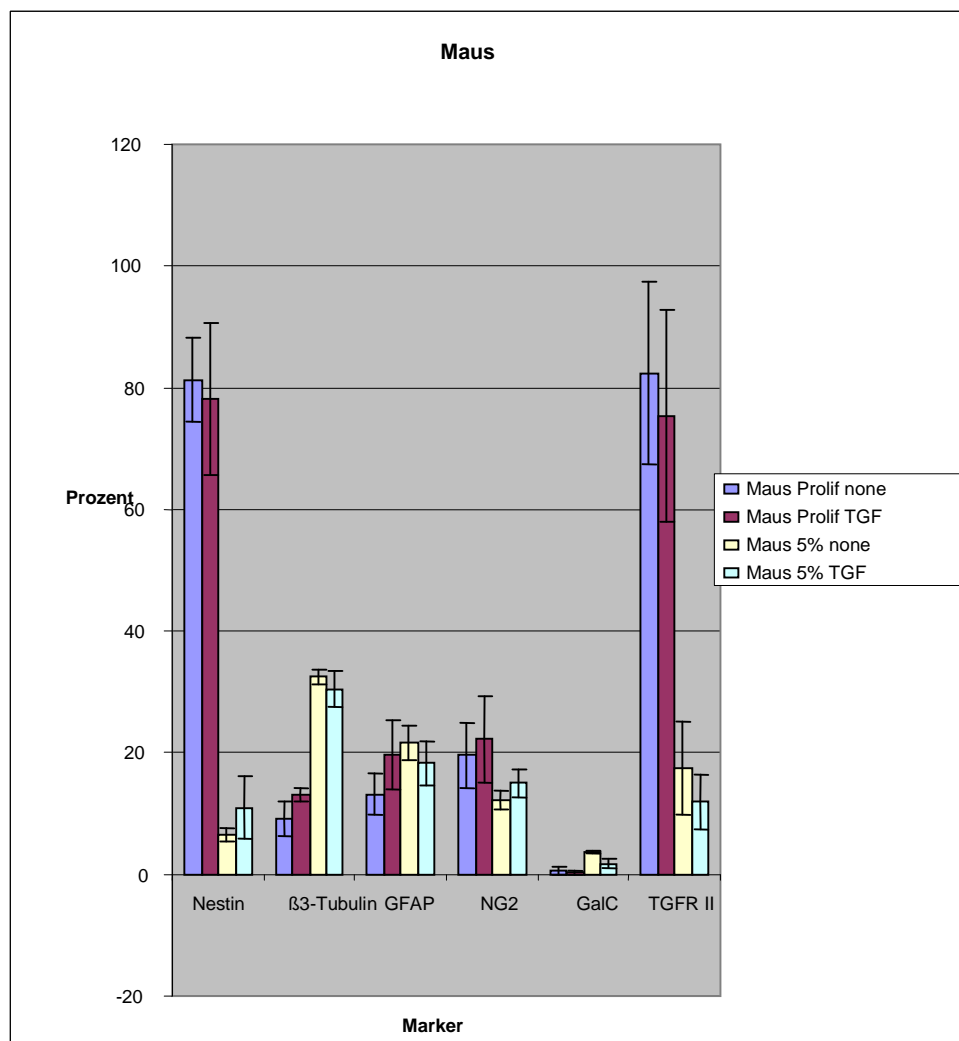


Abbildung 23: Expression verschiedener Marker in Abhängigkeit von TGF $\beta_1$  und 5% FCS (5%).

Es zeigen sich also vergleichbare Effekte der Differenzierungsmedien sowie vergleichbare Expression der untersuchten Antigene unter TGF  $\beta_1$  – Einfluss wie ohne TGF  $\beta_1$  – Einfluss. Man kann daher feststellen, dass TGF  $\beta_1$  weder die Zellidentität oder das Differenzierungspotential neuronaler Vorläuferzellen beeinflusst.

Eine Downregulation des TGF-Rezeptor II unter Einfluss von TGF  $\beta_1$  kann nur tendenziell, aber nicht in statistisch signifikantem Ausmaß beobachtet werden.

Allerdings exprimieren differenzierte Zellen signifikant weniger TGF – Rezeptor als Vorläuferzellen.

## D) Diskussion der Ergebnisse

Diese Arbeit versuchte herauszufinden, welche Faktoren auf die Proliferation und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen Einfluss haben könnten. Beispielhaft wurde daher der Einfluss der neurogenen Region, bestimmter Kulturmedien und des endogenen Faktors TGF- $\beta$ 1 untersucht. Mit Methoden der Immunhistochemie und mit FACS-Analyse wurden in in-vitro Experimenten Vorläuferzellen von adulten Mäusen untersucht und dabei besonderes Augenmerk auf die folgenden Fragen gelegt:

### I. Findet Neurogenese im Rückenmark statt?

Horner et al. konnten nachweisen, dass im Rückenmark der adulten Ratte Vorläuferzellen zu finden sind, die sich hauptsächlich an Ort und Stelle verbleibend teilen und zu astro- sowie oligodendrogialen Zellen ausdifferenzieren (Horner et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch im Rückenmark erwachsener Mäuse Vorläuferzellen residieren, die in Neurospheres wachsen und zu Neuronen ausdifferenzieren können.

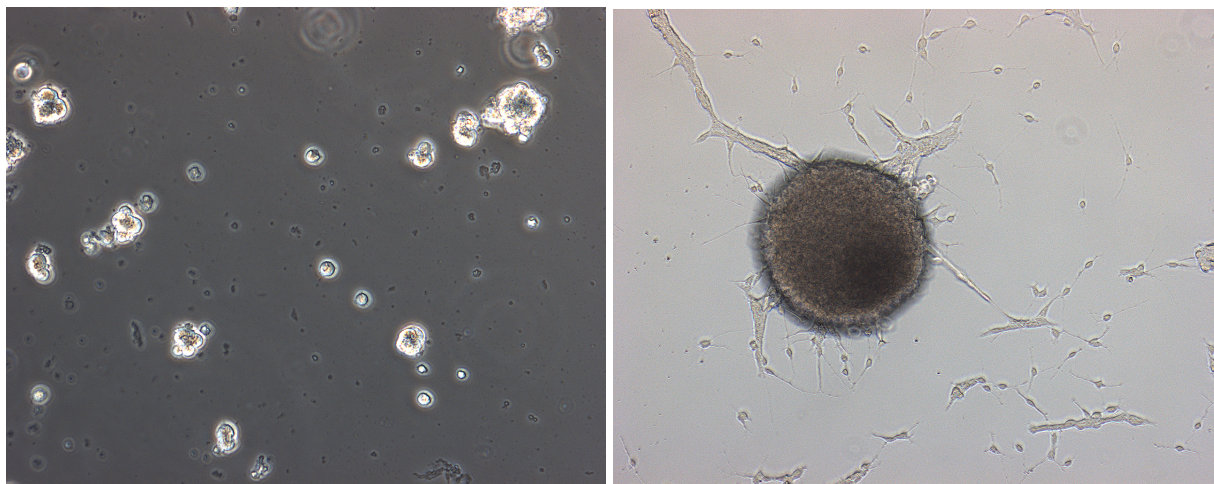


Abbildung 24.: Vorläuferzellen aus dem Rückenmark erwachsener Mäuse nach 8 Stunden (links) bzw. Neurospheres nach 8 Tagen (rechts) in Wachstumsmedium

Das Rückenmark adulter Mäuse kann aber nur bedingt zu den neurogenen Zonen gerechnet werden, da sich in vitro die hieraus gewonnenen Vorläuferzellen zwar tripotent zeigen, in vivo jedoch keine neuronale Differenzierung erfolgt. Zudem wurde nachgewiesen, dass Vorläuferzellen aus dem Hippocampus und der Subventrikulärzone, welche in das Rückenmark transplantiert worden waren, nur in Gliazellen ausdifferenzierten (Shihabuddin et al., 2000). Wie Horner betont (Horner et al., 2000), bleiben Vorläuferzellen im Rückenmark in situ und scheinen nicht aus der Ependymalzone einzuwandern. Dies führt natürlich zu der Frage, ob sich Vorläuferzellen aus dem Rückenmark von jenen aus dem Hippocampus oder aus der Subventrikulärzone unterscheiden, welche ja über den rostra-migratorischen Pfad mit dem Bulbus olfactorius zusammenhängen (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Alvarez-Buylla and Lois, 1995; Goldman, 1995).

## **II. Besteht ein Unterschied zwischen Vorläuferzellen aus den verschiedenen neurogenen Zonen und den verschiedenen Differenzierungsansätzen?**

### **II.1. Proliferationsmedium**

Die immunhistochemische Färbung zeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der Expression von KI67 zwischen den drei untersuchten neurogenen Zonen besteht. Die Proliferationsrate ist also vergleichbar. Dies wird auch durch die FACS-Analyse für SVZ und SC bestätigt. In der Expression von Nestin unterscheiden sich SVZ und Rückenmark ebenfalls nicht, während Vorläuferzellen aus dem Hippocampus hier eine signifikant niedrigere Rate Nestin positiver Zellen aufweisen. Es scheinen also nicht alle proliferationsfähigen Zellen im Hippocampus neuronale Vorläuferzellen zu sein.

## II.2. Behandelte Zellen

Zellen aus allen drei neurogenen Zonen konnten durch sämtliche Differenzierungsansätze in ihrer Proliferation, gemessen an der Expression von KI67, signifikant unterdrückt werden. Ebenfalls verloren sie ihre Identität als neurale Vorläuferzellen, feststellbar durch verminderte Expression von Nestin. Auffällig sind Unterschiede im Differenzierungsverhalten der drei neurogenen Zonen.

Die Subventrikulärzone zeigt nur bei Behandlung mit 5% FCS einen im Vergleich mit unbehandelten Zellen signifikanten Anstieg von  $\beta$ 3-Tubulin, während sie unter cAMP-Einfluss einen im Vergleich mit allen anderen Differenzierungsmedien signifikant höheren Anteil an GFAP positiven Zellen zeigt. Da sich hier der CFK-Wert auch signifikant vom 1% FCS-Wert unterscheidet, lässt sich dieser Unterschied auf einen cAMP-Effekt zurückführen.

Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen aus dem Rückenmark nur unter Behandlung mit CFK ein signifikanter Anstieg von  $\beta$ 3-Tubulin erreicht werden. Dieser unterscheidet sich allerdings nicht signifikant vom Ergebnis, welches mit 1% FCS erreicht wurde, so dass hier ein reiner cAMP-Effekt nicht bewiesen werden kann. Der Anteil GFAP positiver Zellen kann hier durch 1% FCS und CFK signifikant gesteigert werden, nicht aber durch 5% FCS. Der Vergleich von 1% FCS und CFK zeigt auch nur trendmäßig erhöhte Werte GFAP positiver Zellen unter CFK, so dass ein cAMP-Effekt nicht bewiesen werden kann.

Bei Zellen aus dem Hippocampus konnte durch kein Differenzierungsmedium ein Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen erreicht werden, der sich signifikant von dem unbehandelter Zellen unterscheidet. Lediglich trendmäßig konnte eine Erhöhung der Expression von  $\beta$ 3-Tubulin unter 1% und 5% FCS beobachtet werden. Verglichen mit 1% FCS zeigt sich unter Behandlung mit CFK sogar ein signifikant niedrigerer Anteil  $\beta$ 3-Tubulin positiver Zellen, so dass hier angenommen werden kann, dass cAMP die Expression von  $\beta$ 3-Tubulin hemmt. Auch bei Betrachtung von GFAP kann bei Zellen aus dem Hippocampus unter

keinem Differenzierungsmedium ein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass zwar alle drei Zellreihen unter allen Differenzierungsmedien ihr Potential zur Proliferation einbüßen und ihre Identität als Vorläuferzellen verlieren, aber nur Zellen aus der Subventrikulärzone und dem Rückenmark weiter ausdifferenzieren zu neuronalen bzw. astroglialen Zellen, während eine solche Ausdifferenzierung von Zellen aus dem Hippocampus nur trendmäßig zu beobachten ist. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Seaberg und Van der Kooy, dass im Gyrus Dentatus nur eingeschränkt differenzierungsfähige Vorläuferzellen zu finden sind, in der SVZ allerdings multipotente Stammzellen (Seaberg and van der Kooy, 2002). Seaberg und Van der Kooy konnten nachweisen, dass im Gyrus Dentatus des Hippocampus keine Stammzellen im eigentlichen Sinn vorhanden sind, sondern nur in den dem Gyrus Dentatus direkt anliegenden Bereichen der Subependymalzone. Als Quelle der im Gyrus Dentatus gebildeten neuen Neuronen nehmen Seaberg et al. neuron-spezifische Vorläuferzellen und keine multipotenten Stammzellen an.

Des Weiteren scheinen Zellen aus der Subventrikulärzone durch 5% FCS eher in Richtung neuronal und durch cAMP mehr in Richtung astroglial auszdifferenzieren, während Zellen aus dem Rückenmark durch 1% FCS und mehr noch durch cAMP einen Reiz zur Differenzierung in beide Richtungen zu bekommen scheinen. Hier zeigen sich die Stamm- bzw. Vorläuferzellen aus den einzelnen Regionen des ZNS also als eine eher heterogene Gruppe denn als eine singuläre Entität von multipotenten Stammzellen. Ob dies nun daran liegt, dass hier wirklich unterschiedliche Zellentitäten oder nur unterschiedliche Reifegrade einer Stammzelle miteinander verglichen wurden, konnte hier nicht abschließend geklärt werden.



### **II.3. FCS: Die Konzentration macht den Unterschied**

Auffällig ist, dass die Konzentration von FCS durchaus einen Unterschied sowohl im Ausmaß als auch in Qualität der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen macht. Es handelt sich dabei also nicht nur um einen Effekt, der allein durch Entzug von Wachstumsfaktoren zustande kommt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass FCS, welches ja ein nicht standardisiertes Gemisch verschiedenster humoraler Faktoren darstellt, auch eine 2003 neu entdeckte Substanz namens „Serofendic acid“ beinhaltet, welche sich in Versuchen als antioxidativ und neuroprotektiv erwiesen hat (Akaike et al., 2003). Andere antioxidative Substanzen, wie Retinolsäure (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Hung SC et al., 2002) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (Hung SC et al., 2002) werden schon seit langem zur Differenzierung von Vorläuferzellen verwendet.

## **III. Wie verändert TGF- $\beta$ 1 die Eigenschaften der neuralen Vorläuferzellen?**

### **III.1. TGF- $\beta$ 1 moduliert die Zellproliferation**

TGF- $\beta$ 1 moduliert die Zellproliferation (Flanders et al., 1998). Arbeiten mit dem hämatopoetischen System haben gezeigt, dass TGF- $\beta$ 1 Stammzellen über Beeinflussung der Zellzyklusregulatoren p57 und p21 in einem Zellzyklusarrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase hält (Batard et al., 2000; Ducos et al., 2000; Scandura et al., 2004). TGF- $\beta$ 1 spielt bei Reparationsvorgängen in Geweben eine Schlüsselrolle, da es nicht nur Zellproliferation, -überleben und -differenzierung steuert, sondern auch in die Immunantwort modulierend eingreift (Massague, 2000). Auch im adulten ZNS ist TGF- $\beta$ 1 an vielen Vorgängen regulierend beteiligt, v.a. bei krankhaften und verletzungsbedingten Störungen, wie akuten Entzündungen z.B. Enzephalitis Disseminata, neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Alzheimer oder Chorea Huntington, ischämischen Ereignissen, wie Schlaganfall oder traumatischen, wie Schädel-Hirn-Traumen oder Verletzungen

des Rückenmarkes (Lindholm et al., 1992; Flanders et al., 1995; Issazadeh et al., 1995; Mogi et al., 1995; Rimaniol et al., 1995; Krupinski et al., 1996; Lehrmann et al., 1998; Baker et al., 1999; Ilzecka et al., 2002; Krieglstein et al., 2002). Ein wie oben beschriebener Zellzyklusarrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase ist auch bei neurogenen Stammzellen zu beobachten (Siegenthaler and Miller, 2005; Wachs et al.). TGF- $\beta_1$  vermindert die Proliferationsrate neuraler Vorläuferzellen, hat dabei jedoch keinen Einfluss auf die Differenzierung der neurogenen Stammzellen; der Anteil  $\beta$ 3-Tubulin-, GFAP-, NG2- und GalC-positiver Zellen ändert sich unter Differenzierungsbedingungen nicht im Vergleich von TGF- $\beta_1$  behandelten Zellen und unbehandelten Zellen. TGF- $\beta_1$  hat also weder Einfluß auf die Stamm-/ Vorläuferzellidentität, noch auf das Differenzierungspotential. Lediglich eine dosisabhängige Reduktion der Stamm- und Vorläuferzellexpansion (Abb. 25C) mit konsekutiver Reduktion der Zellzahl in Kulturen, aber gleicher Anzahl Neurospheres konnte in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Wachs et al., 2006). Außerdem konnte kein Nachweis eines vermehrten apoptotischen Zelltodes geführt werden (Wachs et al., 2006). In derselben Arbeit konnten diese Ergebnisse in vivo durch Infusion von TGF- $\beta_1$  intracerebrovaskulär bestätigt werden.

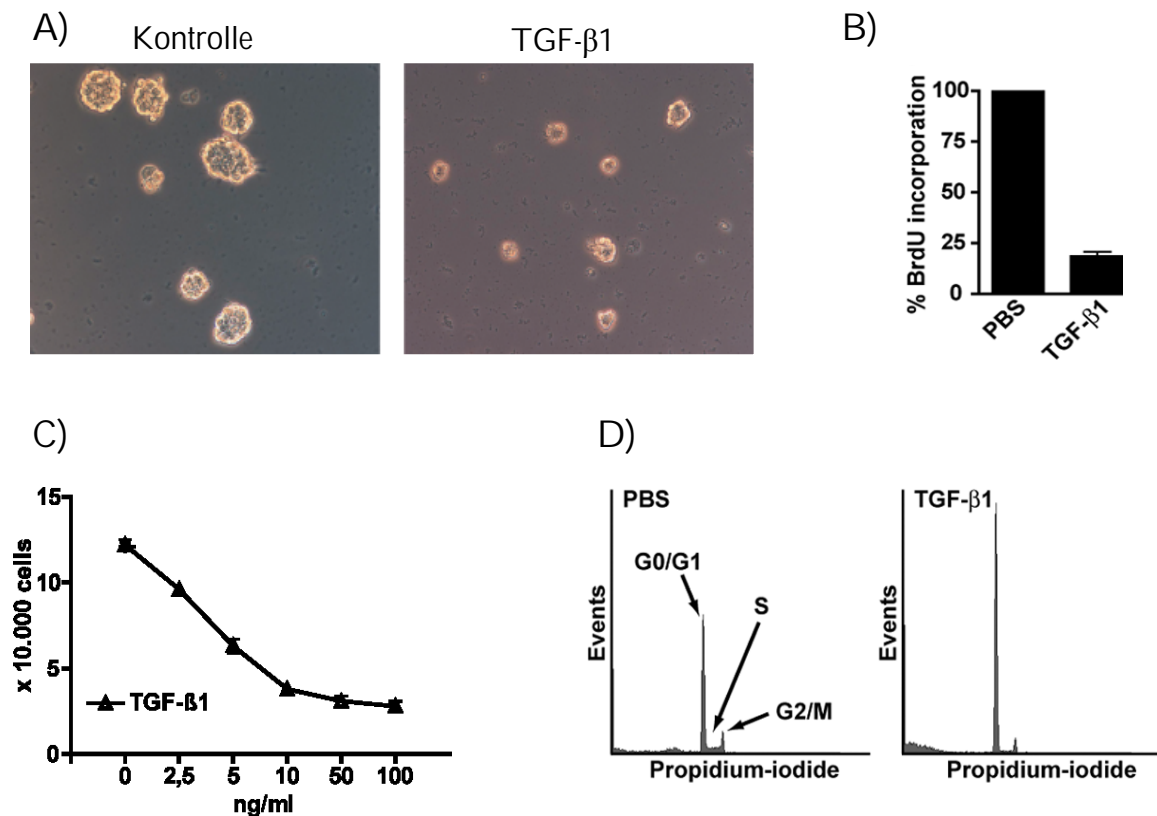


Abbildung 25: TGF-β<sub>1</sub> hemmt die Proliferation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen

A) TGF-β<sub>1</sub> hemmt die Expansion neuraler Stamm- und Vorläuferzellkulturen: die Größe von Neurosphären ist verringert, die Anzahl der Neurosphären ist unverändert. B) TGF-β<sub>1</sub> behandelte Kulturen inkorporieren weniger BrdU. C) Der Effekt auf die Zellexpansion ist dosisabhängig und, D) von einer Zellzyklusarretierung in G0/G1 begleitet. (modifiziert nach (Wachs et al., 2006) in (Aigner L, 2007))

### III.2. Die zwei Seiten des TGF-β<sub>1</sub>

TGF-β<sub>1</sub> scheint also eine Medaille mit zwei Seiten zu sein. Es wirkt im Falle einer Schädigung des ZNS neuroprotektiv, schützt also die Zellen, welche das Primärereignis überlebt haben, vor sekundärem Untergang durch Modulation der Immunreaktion auf das schädigende Ereignis (Massague et al., 2000). Andererseits reagiert das geschädigte ZNS wie jedes andere Gewebe mit dem Versuch, untergegangene Zellen zu ersetzen. Man konnte nachweisen, dass die Neurogeneserate in den neurogenen Regionen durch akute Läsionen gesteigert wird und die neu gebildeten Zellen auch in die von der Noxe betroffenen Regionen einwandern (Arvidsson et al., 2002; Parent et al., 2002; Jin et al., 2006). Sogar in solchen Zonen, wo Neurogenese nur in äußerst geringem Ausmaß oder überhaupt nicht vorkommt, konnte im Falle spezifischer Verletzungen das

Entstehen neuer Zellen nachgewiesen werden (Magavi et al., 2000). Gerade aber jene Proliferation neuer Zellen, welche eine Regeneration des untergegangenen Gewebes und somit eine mögliche restitutio ad integrum gewährleisten könnte, wird durch TGF  $\beta_1$  deutlich vermindert. Somit wird durch TGF  $\beta_1$  zwar das noch nicht untergegangene Gewebe in gewissem Ausmaß geschützt, aber eine Wiederherstellung des bereits abgestorbenen Gewebes verhindert.

## **E) Zusammenfassung**

Adulte neuronale Stammzellen stellen eine attraktive Option zur Therapie neuropathogener Zustände mit Verlust von Gewebe im ZNS dar, seien es traumatische, entzündliche oder chronisch degenerative Erkrankungen. Vor der therapeutischen Nutzbarkeit der Stammzellen müssen diese jedoch erst genau charakterisiert werden; es müssen zudem Medien gefunden werden, in welchen die gewonnenen Stammzellen proliferiert und, dem therapeutische Ziel gemäß, differenziert werden können. Schließlich müssen Wege gefunden werden, humorale und lokale Faktoren im geschädigten ZNS, welche einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung möglicher therapeutischer Stammzellen haben könnten, zu identifizieren und zu beeinflussen.

Diese Arbeit versuchte, einige der möglichen Einflussfaktoren auf neuronale Stammzellen zu untersuchen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass bereits die Herkunft der Stamm- und Vorläuferzellen eine Auswirkung vor allem auf das Differenzierungsverhalten hat. Bei vergleichbarer Proliferationsfähigkeit und Stammzellidentität von Vorläuferzellen aus der Subventrikulärzone, dem Hippocampus und dem Rückenmark zeigte sich unter unterschiedlichen Differenzierungsansätzen zum Teil signifikant unterschiedliches Ansprechen der einzelnen neurogenen Regionen.

Beim Vergleich unterschiedlicher in der Literatur zu findender Differenzierungsansätze, welche zum Teil auf eine Anhebung intrazellulären cAMP's, zum Teil auf Entzug von Wachstumsfaktoren basieren, zeigt sich, dass alle der untersuchten Differenzierungsansätze geeignet sind, die Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen zu suprimieren und diese Zellen ihrer Stammzellidentität zu berauben. Jedoch konnte keine einheitliche Richtung der Differenzierung unter den einzelnen Differenzierungsansätzen festgestellt werden.

Das Ansprechen auf die einzelnen Ansätze war von neurogener Region zu neurogener Region unterschiedlich.

Als Repräsentant für lokale und humorale Faktoren des erkrankten ZNS wurde TGF  $\beta_1$  untersucht. Hier konnte eine signifikante, konzentrationsabhängige, aber reversible Hemmung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen festgestellt werden. Zudem hatte TGF  $\beta_1$  keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen.

- Aigner L, Boghdan U (2007) TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 2008 Jan;331(1):225-41
- Aigner L, WJ, Bogdahn U (2007) Schutz oder Neuaufbau: Neuroprotektive Effekte des Transforming Growth Faktors- $\beta_1$  auf Kosten einer reduzierten Neurogenese? In: *Neuroforum*, pp 4-12.
- Akaike A, Hiroshi Katsuki, Kume T (2003) Pharmacological and physiological properties of serofendic acid, a novel neuroprotective substance isolated from fetal calf serum. *Life Sciences* 74:263-269.
- Altman J, Das GD (1964) Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature* 204:1161-1163.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Alvarez-Buylla A, Lois C (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells (Dayt)* 13:263-272.
- Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P (2001) Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol* 170:48-62.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Ata KA, Lennmyr F, Funä K, Olsson Y, Terent A (1999) Expression of transforming growth factor-beta1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery. *Acta Neuropathol (Berl)* 97:447-455.
- Baghdassarian D, Toru-Delbaffé D, Gavaret JM, Pierre M (1993) Effects of transforming growth factor-beta 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes. *Glia* 7:193-202.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168:342-357.
- Baizabal J-M, Mayra Furlan-Magaril, Jesu's Santa-Olalla and Luis Covarrubias (2003) Neural Stem Cells in Development and Regenerative Medicine. *Archives of Medical Research* 34:572-588.
- Baker CA, Lu ZY, Zaitsev I, Manuelidis L (1999) Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 73:5089-5097.
- Batard P, Monier MN, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, Hatzfeld A, Hatzfeld JA (2000) TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):383-390.
- Berry M (1986) Neurogenesis and gliogenesis in the human brain. *Food Chem Toxicol* 24:79-89.
- Bierie B MH (2006) Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6:506-520.
- Boche D, Cunningham C, Docagne F, Scott H, Perry VH (2006) TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 22:638-650.
- Border WA, Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292.
- Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75:2227-2240.

- Böttner M, Kriegstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75:2227-2240.
- Böttner M UK, Suter-Crazzolara C. (1996) Expression of TGF-beta type II receptor mRNA in the CNS. *Neuroreport* 7:2903-2907.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40:1133-1145.
- Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, Ormerod BK, Chin JT, Palmer T, Wyss-Coray T (2006) Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *Am J Pathol* 169:154-164.
- Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D (1998) Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *Faseb J* 12:1683-1691.
- Cajal (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford: Oxford University Press.
- Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM (2001) TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14:715-725.
- Ciccolini F, Svendsen CN (1998) Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci* 18:7869-7880.
- Close JL, Gumuscu B, Reh TA (2005) Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF{beta} signaling. *Development* 132:3015-3026.
- Constam DB, Schmid P, Aguzzi A, Schachner M, Fontana A (1994) Transient production of TGF-beta 2 by postnatal cerebellar neurons and its effect on neuroblast proliferation. *Eur J Neurosci* 6:766-778.
- Crews FT, Michael W. Miller, Wu Ma, Kim Nixon, W. Michael Zawada, Zakhari S (2003) Neural Stem Cells and Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental research* 27:324-335.
- De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Valk P (1999) Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:174-187.
- de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, Neto VM, Gomes FC (2002) Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur J Neurosci* 16:2059-2069.
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002) Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71:731-740.
- Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (1999) Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *Faseb J* 13:1315-1324.
- Docagne F, Nicole O, Gabriel C, Fernandez-Monreal M, Lesne S, Ali C, Plawinski L, Carmeliet P, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (2002) Smad3-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 in astrocytes mediates neuroprotective activity of transforming growth factor-beta 1 against NMDA-induced necrosis. *Mol Cell Neurosci* 21:634-644.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.



- Ducos K, Panterne B, Fortunel N, Hatzfeld A, Monier MN, Hatzfeld J (2000) p21(cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Cell Physiol* 184:80-85.
- Engelhardt M, Wachs FP, Couillard-Despres S, Aigner L (2004) The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* 78:1025-1036.
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911-926.
- Fisher LJ (1997) Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. *Neurobiol Dis* 4:1-22.
- Fisher LJ, Gage FH (1993) Grafting in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 73:583-616.
- Flanders KC, Ren RF, Lippa CF (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 54:71-85.
- Flanders KC, Lippa CF, Smith TW, Pollen DA, Sporn MB (1995) Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1561-1569.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108:3181-3188.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Gagelin C, Pierre M, Gavaret JM, Toru-Delbauuffe D (1995) Rapid TGF beta 1 effects on actin cytoskeleton of astrocytes: comparison with other factors and implications for cell motility. *Glia* 13:283-293.
- Galter D BM, Unsicker K (1999) Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas. *J Neurosci Res* 56:531-538.
- Gatter KC DM, Gerdes J, Stein H, and Mason DY (1986) New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol* 39:590-593.
- Goldman JE (1995) Lineage, migration, and fate determination of postnatal subventricular zone cells in the mammalian CNS. *J Neurooncol* 24:61-64.
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L (2005) Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci* 23:413-424.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JMG, Herrera DG, Vescovi AL (2002) Multipotent Neural Stem Cells Reside into the Rostral Extension and Olfactory Bulb of Adult Rodents. *J Neurosci* 22:437-445.
- Hansen TO RJ, Nielsen FC (2003) KCl potentiates forskolin-induced PC12 cell neurite outgrowth via protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Neurosci Lett* 347:57-61.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP (2002) Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83:1509-1524.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218-2228.
- Houi K, Kobayashi T, Kato S, Mochio S, Inoue K (2002) Increased plasma TGF-beta1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 106:299-301.
- Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, HL M (2002) In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* 20:522-529.
- Hunter KE, Sporn MB, Davies AM (1993) Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes. *Glia* 7:203-211.

- Ilzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B (2002) Transforming growth factor-Beta 1 (tgf-Beta 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 20:239-243.
- Issazadeh S, Mustafa M, Ljungdahl A, Hojeberg B, Dagerlind A, Elde R, Olsson T (1995) Interferon gamma, interleukin 4 and transforming growth factor beta in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: dynamics of cellular mRNA expression in the central nervous system and lymphoid cells. *J Neurosci Res* 40:579-590.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13198-13202.
- Johns LD, Babcock G, Green D, Freedman M, Sriram S, Ransohoff RM (1992) Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures. *Brain Res* 585:229-236.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kim G, Choe Y, Park J, Cho S, K K (2002) Activation of protein kinase A induces neuronal differentiation of HiB5 hippocampal progenitor cells. *Brain Res Mol Brain Res* 109:134-145.
- Kriegstein K, Farkas L, Unsicker K (1998) TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J Neurobiol* 37:563-572.
- Kriegstein K, Reuss B, Maysinger D, Unsicker K (1998) Short communication: transforming growth factor-beta mediates the neurotrophic effect of fibroblast growth factor-2 on midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 10:2746-2750.
- Kriegstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K (2002) TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris* 96:25-30.
- Kriegstein K, Henheik P, Farkas L, Jaszai J, Galter D, Krohn K, Unsicker K (1998) Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci* 18:9822-9834.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1996) Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* 27:852-857.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Labourdette G, Janet T, Laeng P, Perraud F, Lawrence D, Pettmann B (1990) Transforming growth factor type beta 1 modulates the effects of basic fibroblast growth factor on growth and phenotypic expression of rat astroblasts in vitro. *J Cell Physiol* 144:473-484.
- Laferriere NB, Brown DL (1996) Expression and posttranslational modification of class III beta-tubulin during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:188-199.
- Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Rozovsky I, Young-Chan CS, Zarow C, Finch CE (1994) Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience* 58:563-572.
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B (1998) Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 24:437-448.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.

- Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol* 117:395-400.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Massague J (1987) The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49:437-438.
- Massague J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309.
- McKinnon RD, Piras G, Ida JA, Jr., Dubois-Dalcq M (1993) A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol* 121:1397-1407.
- Miller (2003) Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. *J Comp Neurol* 460:410-424.
- Miller MW, Luo J (2002) Effects of ethanol and transforming growth factor beta (TGF beta) on neuronal proliferation and nCAM expression. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1281-1285.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Narabayashi H, Riederer P, Nagatsu T (1995) Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 193:129-132.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD (2002) Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 8:955-962.
- Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Brandes ME, Mergenhagen SE, Wahl SM (1992) Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol* 39:163-173.
- Morita N, Takumi T, Kiyama H (1996) Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 42:263-271.
- MW. M (2003) Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of prenatal exposure to ethanol. *J Comp Neurol* 460:410-424.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Ni L WY, Peng X, Jonakait GM (2001) Antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and 2-mercaptoethanol (2-ME) affect the survival and differentiative potential of cholinergic precursors from the embryonic septal nuclei and basal forebrain: involvement of ras signaling. *Brain Res Dev Brain Res* 130:207-216.
- Oishi K, Aiko Kobayashi, Katsunori Fujii, Daisuke Kanehira, Yuko Ito, Uchida MK (2004) Angiogenesis In Vitro: Vascular Tube Formation From the Differentiation of Neural Stem Cells. *J Pharmacol Sci* 96:1-11.
- Ostenfeld T SC (2003) Recent advances in stem cell neurobiology. *Adv Tech Stand Neurosurg* 28:3-89.

- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.
- Parent Jack M., Vexler Zinaida S., Gong Chao, Derugin Nikita, M. FD (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of Neurology* 52:802-813.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52:802-813.
- Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, A. B-VE (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76:223-231.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995) The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J* 9:939-945.
- Pratt BM, McPherson JM (1997) TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:267-292.
- Rich JN, Zhang M, Datto MB, Bigner DD, Wang XF (1999) Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J Biol Chem* 274:35053-35058.
- Rimaniol AC, Lekieffre D, Serrano A, Masson A, Benavides J, Zavala F (1995) Biphasic transforming growth factor-beta production flanking the pro-inflammatory cytokine response in cerebral trauma. *Neuroreport* 7:133-136.
- Roussa E, Farkas LM, Kriegstein K (2004) TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiol Dis* 16:300-310.
- Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD (2004) Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15231-15236.
- Seaberg R, van der Kooy D (2002) Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 22:1784-1793.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Shi Y MJ (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-8735.
- Siegenthaler J, Miller M (2005) Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Promotes Cell Cycle Exit through the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 in the Developing Cerebral Cortex. *J Neuroscience* 25:8627-8636.
- Siegenthaler JA, Miller MW (2004) Transforming growth factor beta1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol. *Cereb Cortex* 14:791-802.
- Sousa Vde O, Romao L, Neto VM, Gomes FC (2004) Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur J Neurosci* 19:1721-1730.
- Sousa Vde O AJ, Eller CM, Gomes FC. (2006) Characterization of TGF-beta1 type II receptor expression in cultured cortical astrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42:171-175.
- Stachowiak EK, X. Fang, J. Myers, Dunham S, Stachowiak MK (2003) cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J Neurochem* 84:1296-1312.

- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1993) Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 151:2150-2158.
- Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmiol S, Dunnett SB (1997) Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148:135-146.
- Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1998) Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12:340-348.
- Tanaka Y, Kawahata K, Nakata T, N. H (1992) Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. *Brain Res* 596:269-278.
- Temple S (2001) Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2:513-520.
- Toru-Delbauffe D, Baghdassarian-Chalaye D, Gavaret JM, Courtin F, Pomerance M, Pierre M (1990) Effects of transforming growth factor beta 1 on astroglial cells in culture. *J Neurochem* 54:1056-1061.
- Turbitt ML MR (1986) An assessment of the diagnostic value of the monoclonal antibodies Leu 8, OKT9, OKT10 and Ki67 in cutaneous lymphocytic infiltrates. *Br J Dermatol* 115:151-158.
- van der Wal EA, Gomez-Pinilla F, Cotman CW (1993) Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport* 4:69-72.
- Vawter MP, Dillon-Carter O, Tourtellotte WW, Carvey P, Freed WJ (1996) TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. *Exp Neurol* 142:313-322.
- Vergeli M, mazzanti B, Ballerini C, Gran B, Amaducci L, Massacesi L (1995) Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J Neurosci Res* 40:127-133.
- Vivien D BM, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET, Nouvelot A. (1998) Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 70:2296-2304.
- Wachs F-P, Beate Winner, Sebastien Couillard-Despres, Thorsten Schiller, Robert Aigner, Jürgen Winkler, Ulrich Bogdahn, Aigner L (2006) Transforming growth factor-β1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:358-370.
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:358-370.
- Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C, Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L (2003) High Efficacy of Clonal Growth and Expansion of Adult Neural Stem Cells. *Lab Invest* 83:949-962.
- Winner B, Lie DC, Rockenstein E, Aigner R, Aigner L, Masliah E, Kuhn HG, Winkler J (2004) Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1155-1166.
- Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.
- Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM, Mucke L (1995) Increased central nervous system production of extracellular matrix

components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. Am J Pathol 147:53-67.

- Persönliches: Name: Thorsten Michael Schiller  
Geburtstag: 04. Dezember 1978  
Geburtsort: Passau
- Schulen: 1984-1989: Grundschule Eging am See  
1989-1998: Gymnasium Vilshofen
- Wehrdienst: 1998-1999: Sanitätsdienst der Bundeswehr
- Medizinstudium: Mai-Juli 1999: Krankenpflegepraktikum im  
Kreiskrankenhaus Vilshofen  
1999-2001: Vorklinisches Studium an der Universität  
Regensburg  
Physikum im September 2001  
2001-2004: Klinisches Studium am Klinikum der Universität  
Regensburg  
Erstes Staatsexamen September 2002  
Zweites Staatsexamen September 2004  
Drittes Staatsexamen Oktober 2005
- Zusätzliche Ausbildung:  
Sommersemester 2000: Arbeit als Studentische Hilfskraft im  
Anatomiekurs für das Erste Vorklinische  
Semester, Institut für Anatomie der Universität  
Regensburg, Direktor Prof. Dr. Wrobel  
Sommersemester 2002 und Wintersemester 2002/2003:  
Kurs „Sportmedizin I“ und „Sportmedizin II“  
der Abteilung für Unfallchirurgie der  
Universität Regensburg, Prof. Dr. Nerlich  
Wintersemester 2004/2005: Ultraschallseminar mit  
praktischen Übungen, PD Dr. Schlottmann
- PJ-Tertiale:  
1. Tertial an der Klinik für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin der Universität Regensburg, Direktor  
Prof. Dr. Taeger  
2. Tertial an der Abteilung für Hämatologie und Onkologie  
der Universität Regensburg sowie an der  
University of California, San Diego  
3. Tertial an der Klinik für Unfall-, Hand-,  
Wiederherstellungs- und Wirbelsäulenchirurgie des  
Klinikum Passau, Chefarzt Dr. Obernhuber

Facharztausbildung: Zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie  
seit Dezember 2005 in der Klinik für Unfall-, Hand-, Wieder-  
herstellungs- und Wirbelsäulenchirurgie des  
Klinikum Passau, Chefarzt Dr. Ernst M  
Oberhuber

Rotationen : Oktober 2006 bis März 2007 an der Klinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-, Thorax- und  
Kinderchirurgie am Klinikum Passau,  
Chefarzt Prof. Dr. Grimm

Oktober 2008 bis März 2009 auf der operativen  
Intensivstation der Klinik für Anästhesie und  
operative Intensivmedizin des Klinikum Passau,  
Chefarzt Dr. J. Nußer

seit Februar 2010 in der Klinik für Orthopädie des  
Klinikum Passau, Chefarzt Dr. K. Mayerhofer



Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Aigner für seine Betreuung der Arbeit, seine immerwährende Bereitschaft, mit Ratschlägen und praktischer Hilfe zur Seite zu stehen und nicht zuletzt für seine herzliche und freundschaftliche Art im Umgang miteinander. Auch nach seinem Weggang Richtung Österreich war es daher möglich, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu führen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Frank Peter Wachs bedanken, der freundlicherweise die FACS-Analysen für mich durchgeführt hat, aber auch sonst ein stets hilfsbereiter Ratgeber in Sachen Zellkultur, Gewinnung von Stammzellen etc. gewesen war.

Beim Thema Zellkultur muss ich natürlich auch der "Mutter des Labors" und Chef-CTA, Frau Sonja Plötz, meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne ihre Geduld und ihre fachkundigen Anweisungen hätte diese Arbeit nie entstehen können. Danke, Sonja!

Danke natürlich auch an Herrn Dr. Sebasti  n Couillard-Despres. Er hat mich nicht nur in die Geheimnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie eingeweiht, sondern war ebenfalls stets mit Rat und Tat zur Stelle, wenn es irgendwo haperte. Merci!

Dem Rest der Crew, den Doktoranden Maren und Maurice, sowie den VMTAs Massimiliano und besonders Robert möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die teils "bombige" Stimmung danken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.





